

EFFECTO DE LA RAZA EN LA ACUMULACIÓN DE METALES TÓXICOS Y ESENCIALES EN TERNEROS DE CEBO



Paloma Carbajales Alvarez

Lugo, 2017





TESIS DOCTORAL

EFFECTO DE LA RAZA EN LA ACUMULACIÓN DE METALES TÓXICOS Y ESENCIALES EN TERNEROS DE CEBO

Paloma Carbajales Álvarez

Escola de Doutoramento Internacional
Programa de doutorado en Investigación Básica e Aplicada en Ciencias
Veterinarias
Facultade de Veterinaria
Universidade de Santiago de Compostela

Lugo 2017



Marta I. Miranda Castañón, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Producción Animal e Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidade de Santiago de Compostela, M. Marta López Alonso, Profesora Titular del Departamento de Patoloxía Animal de la Universidade de Santiago de Compostela y Victor Pereira Lestayo Profesor Contratado Doctor del Departamento de Patoloxía Animal de la Universidade de Santiago de Compostela

AUTORIZAN

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Efecto de la raza en la acumulación de metales tóxicos y esenciales en terneros de cebo**”, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. Paloma Carbajales Álvarez, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, no incurriendo en las causas de abstención establecidas en la ley 40/2015.

Y para que conste firman el presente informe en Lugo a 26 de septiembre de 2017.

Fdo.

Marta I. Miranda Castañón

M. Marta López Alonso

Victor Pereira Lestayo



Agradecimientos

Son muchas las personas que me ayudaron a sacar adelante la presente Tesis Doctoral y a las cuales me gustaría agradecerles su apoyo y confianza.

En primer lugar quiero agradecerles a mis directores, Marta I. Miranda, Marta López y a Víctor Pereira, por la confianza depositada en mí, por su paciencia infinita a lo largo de todo este proyecto, por sus consejos impagables y por toda la ayuda incondicional que me brindaron haciendo posible que esta tesis saliera adelante.

A los propietarios de los cebaderos de terneros que desde un principio mostraron un gran interés en este proyecto y que siempre nos facilitaron el trabajo a la hora de la toma de muestras.

A los inspectores veterinarios oficiales y al personal de matadero donde se llevó acabo la recogida de muestras para este proyecto, por su disposición y por todas las facilidades prestadas a la hora de la recogida de las muestras.

A mis compañeros de "pasillo" de Patología y de Médica, por su compañerismo y su ayuda incondicional, especialmente a Inma Orjales y Ruth Rodríguez por ayudarme en el laboratorio, un mundo desconocido para mí.

A mis antiguos compañeros de la Unidad del SAAR y de la Unidad de Équidos del Hospital Universitario Veterinario Rof Codina, que fue donde se empezó a fraguar este proyecto que hoy ve la luz y donde pasé los dos mejores años de mi vida. Especialmente me gustaría agradecerles a Lucas, por estar siempre ahí, te diría mil cosas, pero ya sabes que ese gen mío está mutado.

Al resto de compañeros del Hospital Universitario Veterinario Rof Codina por interesarse en cómo me iba con este proyecto y darme siempre una palabra de ánimo para seguir adelante.

A mi jefe, Diego Herbón, por empujarme siempre hacia delante para que esta Tesis viera la luz, sin importarle dejarme horas y días de dedicación exclusiva al "teseo".

A Daniel Castro Castro, por apostar por mí desde mis inicios profesionales y por no encontrar un no como respuesta, siempre Dominado.

A mis amigos por escucharme siempre, aunque a veces les sonase a chino.

Y por supuesto a mi familia, a mis padres, a mi hermana y a madrina.



Influencia de la raza (leche o carne) sobre la concentración de elementos traza en terneros criados en intensivo para la producción de carne

Effect of breed (dairy or beef) on trace element concentrations in cattle reared intensively for meat production

Influenza da raza (leite ou carne) na concentración de elementos traza en tenreiros criados en intensivo para a produción de carne

RESUMEN

Hasta hace unos años, las dietas animales se suplementaban con minerales en concentraciones muy por encima de sus necesidades fisiológicas. Sin embargo, la preocupación por el medio ambiente ha llevado a un mejor ajuste de la suplementación de minerales en función de las necesidades fisiológicas reales. En este contexto, la consideración de las diferencias relacionadas con la raza en las necesidades de oligoelementos es un factor a tener en cuenta. El objetivo de este estudio fue analizar las concentraciones de oligoelementos en las principales razas de vacuno utilizadas para la producción de carne en intensivo en el norte de España: Rubia Gallega (RG), Frisona (HF), y el cruce de ambas razas (RGxHF). Se sacrificaron 10 terneros de cada raza a los 10 meses de edad en matadero y se obtuvieron muestras de sangre, hígado, riñón, bazo, cerebro y músculo. En general, las concentraciones de elementos traza en el suero y en los órganos se encontraban dentro de los niveles adecuados en todos los terneros, lo que sugiere que la suplementación de minerales traza fue adecuada en todos los grupos. La única excepción a esto fue el cobre, las concentraciones de cobre en hígado fueron superiores a los niveles adecuados (25-100 mg/kg de peso fresco) en todos los terneros. Esto fue particularmente evidente en los terneros HF, superándose el nivel máximo recomendado para el consumo humano (140 mg/kg de peso fresco) en el 90% de estos animales. Las concentraciones de cobre, hierro, manganeso, selenio y zinc en el músculo fueron significativamente más altas en HF que en los terneros RG. Los cruces de ambas razas mantuvieron una posición intermedia. Estas diferencias relacionadas con la raza en las concentraciones de elementos traza en el músculo pueden estar relacionadas con una menor masa muscular y/o una mayor actividad hepática en los terneros HF (de leche) que en los terneros RG (de carne). Como la carne es una fuente esencial de oligoelementos altamente disponibles en las dietas humanas, las diferencias relacionadas con la raza en las concentraciones de oligoelementos en la carne merecen más investigación.

Palabras clave: elementos traza, raza, ganado vacuno, sistemas intensivos, tejidos

SUMMARY

Until recently, animal feed has traditionally been supplemented with trace elements at dietary concentrations well above physiological needs. However, environmental concerns have led to calls for better adjustment of mineral supplementation to actual physiological needs and, in this context, consideration of breed-related differences in trace element requirements. The aim of this study was to analyze trace element concentrations in the main breeds used for intensive beef production in northern Spain (Holstein-Friesian [HF], Galician Blonde [GB] and GBxHF cross). Samples of blood, internal organs (liver, kidney, spleen, brain) and muscle were obtained at slaughter (at age 10 months) from HF, GB and GBxHF cross calves (ten of each) in

the same feedlot. Overall, trace element concentrations in serum and internal organs were within adequate ranges in all calves and did not differ between breeds, suggesting that trace mineral supplementation was adequate in all groups. The only exception to this was copper, and hepatic copper concentrations were above adequate levels (25-100 mg kg⁻¹ fresh weight) in all calves. This was particularly evident in the HF calves, and the maximum recommended level for human consumption (140 mg kg⁻¹ fresh weight) was exceeded in 90% of these animals. Copper, iron, manganese, selenium and zinc concentrations in muscle were significantly higher in the HF than in the GB calves. The concentrations of the elements were always intermediate in the cross-bred calves. These breed-related differences in trace element concentrations in the muscle may be related to lower muscle mass and/or higher hepatic activity in the HF (dairy) calves than in the GB (beef) calves. As meat is an essential source of highly available trace elements in human diets, breed-related differences in trace element concentrations in meat deserve further investigation.

Key words: trace elements, breed, beef cattle; intensive systems; organs

RESUMO

Ata hai uns anos as dietas animais suplementábanse con minerais en concentracións moi por riba das súas necesidades fisiolóxicas. Sen embargo a preocupación polo medio ambiente levou a un mellor axuste da suplementación de minerais en función das necesidades fisiolóxicas reais. Neste contexto, a consideración das diferenzas relacionadas coa raza nas necesidades de oligoelementos é un factor a ter en conta. O obxectivo deste estudo foi analizar as concentracións de oligoelementos nas principais razas de vacún utilizadas para a produción de carne en intensivo no norte de España: Rubia Galega (RG), Frisona (HF), e o cruzamento de ambas razas (RGxHF). Sacrificáronse 10 tenreiros de cada raza aos 10 meses de idade en matadoiro e obtivéronse mostras de sangue, fígado, ril, bazo, cerebro e músculo. En xeral, as concentracións de elementos traza no soro e nos órganos atopábanse dentro dos niveis adecuados en todos os tenreiros, o que suxire que a suplementación de minerais traza foi adecuada en todos os grupos. A única excepción a isto foi o cobre, as concentracións de cobre en fígado foron superiores aos niveis adecuados (25-100 mg/kg de peso fresco) en todos os tenreiros. Isto foi particularmente evidente nos tenreiros HF, superándose o nivel máximo recomendado para o consumo humano (140 mg/kg de peso fresco) no 90% destes animais. As concentracións de cobre, ferro, manganeso, selenio e zinc no músculo foron significativamente máis altas en HF que nos tenreiros RG. Os cruces de ambas razas mantiveron unha posición intermedia. Estas diferenzas relacionadas coa raza nas concentracións de elementos traza no músculo poden estar relacionadas cunha menor masa muscular e/ou unha maior actividade hepática nos tenreiros HF (de leite) que nos tenreiros RG (de carne). Como a carne é unha fonte esencial de oligoelementos altamente dispoñibles nas dietas humanas, as diferenzas relacionadas coa raza nas concentracións de oligoelementos na carne merecen máis investigación.

Palabras chave: elementos traza, raza, gando vacún, sistemas intensivos, tecidos

Influencia de la aptitud racial (leche o carne) sobre la concentración de elementos traza en músculo

How important is beef or milk breed-aptitude on determining trace element concentration in muscles?

Influência da aptitude racial (leite ou carne) na concentração de elementos traza en músculo

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar las concentraciones de elementos traza en varios músculos con diferente perfil oxidativo o glicolítico: diafragma (DI) y cardíaco (CA) (típico oxidativo), trapecio (TR) (intermedio oxidativo-glicolítico) y semimembranoso (SM) (típico glicolítico) en una raza de aptitud láctea (Frisona: HF); una raza de aptitud cárnica (Rubia Gallega: RG) y el cruce de ambas razas (RGxHF). Se sacrificaron 10 terneros de cada raza en matadero y se obtuvieron muestras de los distintos músculos. Las concentraciones de elementos traza se determinaron por ICP-MS. Nuestros resultados indican que el tipo de músculo fue un factor muy significativo en el análisis de todos los elementos, mientras que la raza sólo fue significativa para Fe, Mn y Zn. Sólo se encontraron diferencias raciales significativas en SM: donde los terneros de raza RG y los cruces (RGxHF) mostraron una concentración significativamente menor de los principales oligoelementos (Cu, Fe, Se y Zn) que los HF. La concentración de estos oligoelementos en el músculo SM se asoció negativamente con el rendimiento de la canal. Aparte de este comportamiento particular para SM, el patrón de distribución de estos elementos en los otros músculos fue similar en los tres grupos raciales con concentraciones de oligoelementos significativamente más altas en CA, seguido por DI, mientras que en el SM y TR las concentraciones de los elementos traza fueron muy similares. Para los otros elementos que estaban a concentraciones muy bajas en el músculo (Co, Cr, Mo y Ni) no se observó ningún patrón asociado. Nuestros resultados indican que las diferencias interracial observadas en las concentraciones de elementos traza en el músculo en nuestro estudio (SM) se relacionan principalmente con diferencias en su perfil oxidativo-glicolítico, probablemente relacionado con el grado de hipertrofia de algunos músculos en razas muy musculadas.

Palabras clave: elementos traza, músculo, raza, carne, leche

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate trace element concentrations in several muscles with different oxidative/glycolytic profile: diaphragm (DI) and cardiac (CA) (typical oxidative), trapezius (TR) (intermediate oxidative/glycolytic) and semimembranosus (SM) (typical glycolytic) in a milk-aptitude breed (Holstein-Friesian: HF); a beef-aptitude breed (Galician Blonde: GB) and their crosses (GB x HF). Ten animals from each breed reared in a commercial feedlot receiving a standard diet were sampled at slaughter. Trace element concentrations were determined by ICP-MS. Our results indicate that type of muscle was a highly significant factor in the analysis for all elements, whereas breed was only significant for Fe, Mn and Zn. We found only significant breed differences in SM: where GB and crosses showed significantly lower concentration of the main trace elements (Cu, Fe, Se and Zn) than HF. Concentration of

these trace elements in the SM muscle were negatively associated with carcass performance. Apart from this particular behavior for SM, the pattern of distribution of these elements in the other types of muscles was similar in the three breed groups with significantly higher trace element concentrations in the CA, followed by the DI, whereas in the SM and TR trace element concentrations were very similar. For the other elements that were at very low concentrations in the muscle (Co, Cr, Mo and Ni) any distribution pattern could be derived. Our results indicate that the interbreed differences observed in trace element concentrations in muscle in our study (SM) are mainly related to differences on their oxidative/glycolytic profile, probably relate to the hypertrophy degree of some muscles in very muscled breeds.

Keywords: trace elements, muscle, breed, beef, milk

RESUMO

O obxectivo deste estudo foi avaliar as concentracións de elementos traza en varios músculos con diferente perfil oxidativo ou glicolítico: diafragma (DI) e cardíaco (CA) (típico oxidativo), trapecio (TR) (intermedio oxidativo-glicolítico) e semimembranoso (SM) (típico glicolítico) nunha raza de aptitude láctea (Frisona: HF); unha raza de aptitude cárnica (Rubia Galega: RG) e no cruzamento de ambas razas (RGxHF). Sacrificáronse 10 tenreiros de cada raza en matadoiro e obtivéronse mostras do distintos músculos. As concentracións de elementos traza determináronse por ICP-MS. Os nosos resultados indican que o tipo de músculo foi un factor moi significativo na análise de todos os elementos, mentres que a raza só foi significativa para Fe, Mn e Zn. Só se encontraron diferenzas raciais significativas en SM, onde os tenreiros de raza RG e os cruces (RGxHF) mostraron unha concentración significativamente menor dos principais oligoelementos (Cu, Fe, Se e Zn) que os HF. A concentración destes oligoelementos no músculo SM asociouse negativamente co rendemento da canle. Aparte deste comportamento particular para o SM, o patrón de distribución destes elementos nos outros músculos foi similar no tres grupos raciais con concentracións de oligoelementos significativamente máis altas en CA, seguido por DI, mentres que no SM e TR as concentracións dos elementos traza foron moi similares. Para os outros elementos que estaban en concentracións moi baixas no músculo (Co, Cr, Mo e Ni) non se observou ningún patrón asociado. Os nosos resultados indican que as diferenzas interracialis observadas nas concentracións de elementos traza no músculo no noso estudo (SM) relaciónanse principalmente con diferenzas no seu perfil oxidativo-glicolítico, probablemente relacionado co grao de hipertrofia dalgúns músculos en razas moi musculadas.

Palabras chave: elementos traza, músculo, raza, carne, leite

Distribución subcelular del cobre hepático en terneros de carne suplementados con altos niveles de cobre

Subcellular distribution of hepatic copper in beef cattle receiving high copper supplementation

Distribuição subcelular do cobre hepático em tenreiros de carne suplementados com altos níveis de cobre

RESUMEN

Estudios previos realizados en terneros de cebo en el noroeste de España han revelado una mayor acumulación de cobre (Cu) en el hígado de animales de raza Frisona (HF) que de Rubia Gallega (RG) o del cruce RGxHF al recibir una dieta suplementada con la concentración máxima de Cu permitida en la legislación de la UE (35 mg/kg). Este estudio tiene como objetivo evaluar si esta diferencia se debe al patrón de acumulación intracelular de Cu en el hígado. Para ello se analizaron muestras de hígado de 10 terneros de raza RG, 9 de raza HF y 10 de cruce de RGxHF para determinar el contenido de metalotioneínas (MT), Cu y zinc (Zn) (en el hígado (hígado Cu y hígado Zn) y su unión con metalotioneínas (Cu - MT y Zn - MT)). También se determinó la distribución del Cu dentro de los principales compartimentos intracelulares (núcleos, gránulos grandes, microsomas y citosol). A pesar de que los animales HF mostraron concentraciones de Cu significativamente más altas ($P < 0,05$) en el hígado (161 ± 10 mg/kg de peso húmedo) en comparación con RG (132 ± 8 mg/kg), no se observaron diferencias relacionadas con la raza en ningún otro parámetro analizado en este estudio. En general, el patrón de acumulación hepática a nivel intracelular fue similar al descrito anteriormente en vacuno: (i) las concentraciones de MT fueron menores que en otras especies animales, pero muy relacionadas con el Zn hepático; (ii) un bajo porcentaje de Cu (6,61%) se unió a MT pero esto se relacionó muy negativamente con la relación Cu:Zn en las células hepáticas; y (iii) la mayor proporción de Cu (57,3%) se encontró en la fracción de gránulos grandes (con contenido de lisosomas). Todos estos resultados indican una baja capacidad de los bovinos para excretar Cu por la bilis, dando como resultado una alta acumulación de Cu en las células hepáticas.

Palabras clave: acumulación de cobre, hígado, metalotioneínas, distribución intracelular, vacuno de carne, sistemas intensivos, zinc

SUMMARY

Previous studies of intensively reared cattle in NW Spain have reported significantly higher copper (Cu) accumulation in the liver in Holstein-Friesian (HF) animals than in Galician Blonde (GB) or GBxHF crosses when receiving a diet supplemented at the maximum Cu concentrations allowed in the EU legislation (35 mg/kg). The present study aimed to evaluate whether this difference is due to the pattern of subcellular accumulation of Cu in the liver. For this purpose, liver samples from 10 GB, 9 HF and 10 GBxHF young bulls were analysed to determine the content of metallothionein (MT) and Cu and zinc (Zn) (in the liver (Cu-liver and Zn-liver) and bound to metallothionein (Cu-MT and Zn-MT)). The Cu distribution within the main subcellular compartments (nuclei, large granule, microsomes and cytosol) was also determined.

Even though HF animals showed significantly higher ($P<0.05$) Cu concentrations in the liver (161 ± 10 mg/kg wet weight) compared with GB (132 ± 8 mg/kg), no breed-related differences were observed for any of the parameters considered in this study. Overall, the pattern of hepatic subcellular accumulation was similar to that previously described in cattle: (i) MT concentrations were lower than in other animal species but strongly related to hepatic Zn; (ii) a low proportion of Cu (6.61%) was bound to MT but this was strongly and negatively related to the Cu:Zn ratio in the liver cell; and (iii) the highest proportion of Cu (57.3%) was found in the large granule (lysosome containing) fraction. All these results indicate a low capacity of cattle to excrete Cu by the bile resulting in a high Cu accumulation in the liver cell.

Keywords: copper accumulation, liver, metallothionein, subcellular distribution, cattle breed, zinc

RESUMO

Estudos previos realizados en tenreiros de cebo no noroeste de España revelaron unha maior acumulación de cobre (Cu) no fígado de animais de raza Frisona (HF) que de Rubia Galega (RG) ou do seu cruzamento (RGxHF) ao recibir unha dieta suplementada coa concentración máxima de Cu permitida na lexislación da UE (35 mg/kg). Este estudo ten como obxectivo avaliar se esta diferenza se debe ao patrón de acumulación intracelular de Cu no fígado. Para iso analizáronse mostras de fígado de 10 tenreiros de raza RG, 9 de raza HF e 10 de cruzamento de RGxHF para determinar o contido de metalotioneínas (MT), Cu e zinc (Zn) (no fígado (fígado Cu e fígado Zn) e a súa unión con metalotioneínas (Cu-MT e Zn-MT)). Tamén se determinou a distribución do Cu dentro dos principais compartimentos intracelulares (núcleos, gránulos grandes, microsomas e citosol). A pesar de que os animais HF mostraron concentracións de Cu significativamente máis altas ($P < 0,05$) no fígado (161 ± 10 mg/kg de peso húmido) en comparación cos RG (132 ± 8 mg/kg), non se observaron diferenzas relacionadas coa raza en ningún outro parámetro analizado neste estudo. En xeral, o patrón de acumulación hepática a nivel intracelular foi similar ao descrito anteriormente en vacún: (i) as concentracións de MT foron menores que noutras especies animais, pero moi relacionadas co Zn hepático; (ii) unha baixa porcentaxe de Cu (6,61%) uniuse a MT pero isto relacionouse moi negativamente coa relación Cu:Zn nas células hepáticas; e (iii) a maior proporción de Cu (57,3%) atopouse na fracción de gránulos grandes (con contido de lisosomas). Todos estes resultados indican unha baixa capacidade dos bovinos para excretar Cu pola bile, dando como resultado unha alta acumulación de Cu nas células hepáticas.

Palabras chave: acumulación de cobre, fígado, metalotioneínas, distribución intracelular, vacún de carne, sistemas intensivos, zinc.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
RESÚMENES	III
INDICES DE CONTENIDOS	IX
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE TERNEROS	3
1.2. EVALUACIÓN DEL ESTADO MINERAL	4
1.3. NECESIDADES MINERALES	5
1.4. INFLUENCIA DE LA RAZA EN EL METABOLISMO DE LOS ELEMENTOS TRAZA	6
1.4.1. Ganado ovino	7
1.4.2. Ganado vacuno	8
1.5. VARIACIÓN CONTENIDO DE ELEMENTOS TRAZA EN MÚSCULOS Y ÓRGANOS	11
1.6. METALOTIONEÍNAS Y FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	13
1.6.1. Metalotioneínas	13
1.6.2. Fraccionamiento subcelular	15
1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
2. OBJETIVOS	23
3. CAPITULOS	27
3.1. INFLUENCIA DE LA RAZA (LECHE O CARNE) SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN TERNEROS CRIADOS EN INTENSIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE CARNE	29
3.2. INFLUENCIA DE LA APTITUD RACIAL (LECHE O CARNE) SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN MÚSCULO	45
3.3. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DEL COBRE HEPÁTICO EN TERNEROS DE CARNE SUPLEMENTADOS CON ALTOS NIVELES DE COBRE	63
4. CONCLUSIONES	79
5. ANEXOS (PUBLICACIONES)	83
5.1. TRACE ELEMENT CONCENTRATIONS IN BEEF CATTLE RELATED TO THE BREED APTITUDE. <i>Biological Trace Element Research</i> .	85
5.2. IMPORTANCE OF BREED APTITUDE (BEEF OR DAIRY) IN DETERMINING TRACE ELEMENT CONCENTRATIONS IN BOVINE MUSCLES. <i>Food and Chemical Toxicology</i> .	105
5.3. SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF HEPATIC COPPER IN BEEF CATTLE RECEIVING HIGH COPPER SUPPLEMENTATION. <i>Journal of Trace Elements in Medicine and Biology</i> , 42: 111-116.	129



Introducción general





1. INTRODUCCION GENERAL

1.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE TERNEROS

La producción de terneros se caracteriza por la amplia variedad de razas y de sistemas de producción, lo que conduce a una gran diversidad en los rendimientos de crecimiento, en los pesos al sacrificio y en las características de las canales. Los terneros pesan al nacimiento 40-50 kg, dependiendo de la raza y de la alimentación de la madre durante la gestación. El sistema de cría (lactación artificial o natural) y la edad al destete dependen básicamente de la orientación de la explotación (leche o carne). La cría intensiva con lactancia artificial se realiza en las explotaciones de terneros mamoneros, mientras que la lactancia natural se realiza en explotaciones con pastizales. Una vez destetados, la mayoría de los terneros se ceban en sistemas intensivos; su peso final depende de la raza, la edad y la velocidad de crecimiento, que a su vez es función de la alimentación que ha recibido el animal. Los sistemas de cebo de terneros se pueden clasificar en cuatro tipos:

1. *Ternera blanca*: Son terneros procedentes de explotaciones de leche, que se mantienen con lactancia artificial hasta los 4 meses de vida con unos 200 kg de peso, en que se sacrifican, la velocidad de crecimiento es muy alta (1–1.5 kg diarios). No obstante la producción de ternera blanca en España es muy escasa.

2. *Terneros sacrificados al destete*: parte de los terneros procedentes de explotaciones de vacas de carne de zonas húmedas (especialmente en Galicia) se sacrifican al destete, a los 6–8 meses de vida, con un peso de 250–300 kg de peso vivo. Estos terneros han consumido básicamente la leche de la madre y pequeñas cantidades de pienso y el forraje de la zona y suponen alrededor de un 15% de todos los terneros sacrificados dependiendo del año.

3. *Terneros en cebo semintensivo*: este sistema se utiliza para otra parte de los terneros de la zona húmeda, especialmente donde existen cantidades importantes de forraje. Los animales pastorean y reciben suplementación de concentrados en pesebre y representan aproximadamente el 10% de la producción nacional.

4. *Terneros en cebo intensivo*: es el típico sistema de engorde español, se basa en 85-90% de concentrados, normalmente rico en cereales y entre un 10-15% de paja de cebada o de trigo. Este sistema representa el 75% de los terneros sacrificados en España. El cebo se realiza en explotaciones sin tierra, exceptuando los que tienen derecho a subvención por nodriza, utilizando altos porcentajes de concentrados en la ración y paja. La alimentación es a libre disposición. Una de las principales ventajas

del cebo intensivo, junto con la calidad del producto final, es la alta velocidad de crecimiento que se consigue, lo que permite un ciclo de producción relativamente corto.

En total, este tipo de producción representa casi el 50% de todos los terneros sacrificados a nivel nacional. Otro tipo de producto final que se obtiene con este sistema son los terneros añejos que se sacrifican hacia el año de edad con unos 500 kg de peso vivo (280-300 kg de canal) suelen ser terneros de razas cárnicas nacionales o de importación y representan alrededor del 25% de los terneros sacrificados. La velocidad de crecimiento durante el cebo intensivo es muy variable, desde los 800 g/d hasta los 2 kg dependiendo de la edad y la raza. La ingestión diaria depende también del tipo de ternero que se esté cebando, siendo alrededor del 1.5% del peso vivo. Así un ternero frisón de 400 kg que crece 800 g/día ingiere diariamente 6-7 kg de pienso al día, mientras que la misma ingestión en kg totales del mismo pienso, permite a un ternero charolés de 400 kg un crecimiento de 1.200 g/día. Esto es debido a que el primero deposita parte de la energía ingerida en forma de grasa y el segundo en forma de músculo. El índice de conversión es de unos 5-7 kg de pienso por kg de aumento de peso vivo, dependiendo del engrasamiento de la canal. El consumo de paja normalmente es de 0.5-1 kg al día (10-20% de la ración) (Bacha, 2002).

1.2. EVALUACIÓN DEL ESTADO MINERAL

Los minerales, tanto macrominerales (Ca, P, K, Mg, N, Na y S) como microminerales (Co, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se, Zn,...) son esenciales para mantener la salud y la productividad animal. Una nutrición óptima, con niveles de minerales adecuados, garantiza las funciones propias del organismo, entre las cuales las más importantes son las funciones estructurales, fisiológicas, catalíticas y reguladoras (Suttle, 2010).

Para poder valorar correctamente el estatus mineral se debe analizar en primer lugar la existencia de síntomas clínicos o subclínicos de pérdida de producción, la concentración de minerales en los distintos tejidos y sangre, la presencia o no de lesiones en los tejidos mediante un examen patológico de los mismos en caso de que se realice una necropsia y las concentraciones del mineral en la dieta (Suttle, 2010). Muchas veces la evaluación del estado mineral en el animal es difícil. Los análisis deben ser realizados en un momento concreto del ciclo de productivo, teniendo en cuenta el nivel de estrés del animal, el tipo de análisis, el antagonismo entre los diferentes elementos y la naturaleza de los alimentos complementarios utilizados. Por ejemplo las concentraciones de cobre en sangre no son buenos indicadores del estatus de cobre, ya que no todo el cobre está disponible para el animal y no se correlaciona con las concentraciones de cobre en el hígado (Herdt and Hoff, 2011): así animales con niveles de cobre bajos en plasma pueden tener niveles adecuados de cobre hepático o viceversa. Por tanto es muy importante integrar todos los datos para tener una correcta interpretación.

Por otro lado la acumulación orgánica tanto de metales tóxicos como esenciales va a verse condicionada por diferentes factores, por lo que es difícil poder establecer una

relación directa entre los niveles de exposición y las concentraciones tisulares encontradas. Estos factores pueden ser propios del animal (especie, raza, sexo, edad) o depender de otros factores (dieta, interacciones entre elementos, etc.).

1.3. NECESIDADES MINERALES

Los minerales deben ser proporcionados en concentraciones óptimas y de acuerdo con los requisitos que cambian durante el crecimiento y desarrollo del animal y durante el ciclo de producción. Es bastante difícil justificar el término “requerimientos” cuando hablamos de minerales de la misma manera que lo hacemos para la energía, proteína o aminoácidos (López-Alonso, 2012). Los requerimientos de minerales son difíciles de establecer y la mayoría de las estimaciones se basan en el nivel mínimo necesario para superar la deficiencia o un síntoma, y no necesariamente en la promoción de la productividad (Close, 2006, López-Alonso, 2012).

Muchas autoridades (INRA en Francia, ACR en el Reino Unido o FEDNA en España) han recomendado las necesidades de minerales para asegurar que la producción de ganado no se deteriore por desequilibrios minerales en la dieta, sin embargo, el consenso entre ellos no es común. Las recomendaciones para el ganado de carne en EE.UU. son las más recientemente actualizadas ya que fueron revisadas en 2016 (NRC, 2016). En Europa la Agencia de Seguridad Alimentaria (EFSA) es la encargada de definir las concentraciones máximas de minerales permitidas en las dietas de los diferentes sistemas de producción. Las recomendaciones minerales deben incluir un margen de seguridad para tener en cuenta la presencia de antagonistas (López-Alonso et al., 2004; Blanco-Penedo et al., 2006; Blanco-Penedo et al., 2009; Suttle, 2010; López-Alonso et al., 2011; López-Alonso, 2012). Por ejemplo, en los rumiantes la absorción de cobre se inhibe con molibdeno, azufre y, en menor medida, por el hierro (Suttle, 2010) y los altos niveles de calcio en la alimentación pueden inhibir la absorción de zinc. También se estableció que se requieren niveles más altos de cobre en presencia de altos niveles de zinc y que los animales sometidos a estrés requieren niveles más altos de cobre y zinc.

Por otra parte, cuando se determinan las necesidades de minerales y la suplementación, se debe prestar atención a la cantidad y el tipo de ingredientes crudos y su contenido mineral inherente, el procesado de la dieta, las condiciones de almacenamiento y ambientales, así como las diferencias en la biodisponibilidad y las interacciones con otros nutrientes (principalmente otros oligoelementos) (Close, 2006; López-Alonso, 2012), la suplementación recomendada incluye un factor de seguridad adicional para asegurar que la demanda promedio de la población se cubre (NRC, 2016). En la práctica, esto es factible porque, en la mayoría de los casos, las concentraciones dietéticas de oligoelementos pueden formularse con grandes márgenes de seguridad, de modo que la ingesta puede exceder los requerimientos sin representar un riesgo para la salud animal (López-Alonso y Miranda, 2012). De hecho, en general se supone que la suplementación adecuada de minerales traza es barata y de sobra se compensan los costos adicionales de un posible exceso (Petersen, 1999). Sin embargo, en los últimos años ha surgido una preocupación en la Unión Europea por el ajuste de la suplementación mineral a las necesidades fisiológicas reales, ya que grandes cantidades

de oligoelementos (principalmente cobre y zinc) se acumulan en el medio ambiente como consecuencia de la suplementación animal por encima de las necesidades nutricionales (EFSA, 2014, 2016). En esta línea, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomendó muy recientemente que se reduzcan los niveles máximos de cobre en piensos para bovinos de 35 a 30 mg/kg (EFSA, 2016).

Para poder ajustar la suplementación de oligoelementos a las necesidades nutricionales reales, además de la dieta y las posibles interacciones entre oligoelementos también debemos tener en cuenta factores del propio animal, como son la edad, el sexo, la especie y la raza entre otros. Centrándonos en la raza que es el tema de estudio de esta tesis doctoral, está bien establecido que las necesidades de minerales pueden variar entre razas (Pogge et al., 2012), factor a tener en cuenta a la hora de ajustar los suplementos de los animales. Así por ejemplo, la mayor acumulación de cobre en hígado observada en terneros de aptitud láctea (raza Frisona) en comparación con terneros de aptitud cárnica (raza Rubia Gallega) cuando se crían en cebadero para la producción de carne, con suplementación estándar de elementos traza puede estar relacionada con una menor movilización de cobre hacia el músculo en los terneros de aptitud láctea que tienen menor masa muscular (Miranda et al., 2010a). Esto nos hace suponer que probablemente los animales de aptitud láctea utilizados para la producción de carne necesiten niveles más bajos de suplementos de elementos traza debido a una menor masa muscular.

1.4. INFLUENCIA DE LA RAZA EN EL METABOLISMO DE LOS ELEMENTOS TRAZA

La importancia del componente racial en el metabolismo mineral se ha constatado principalmente para el cobre y en el ganado ovino, donde existen marcadas diferencias genéticas en cuanto a la eficacia de absorción gastrointestinal del cobre de la dieta y a la excreción biliar. Esto ha permitido clasificar a las razas de ovejas en susceptibles o resistentes a la intoxicación por cobre, y de esta forma, no solo ajustar los suplementos a los requerimientos reales de los animales, sino la posibilidad de realizar una selección racial específica según las características de cada región geográfica (Suttle, 2010). Otra especie en la que la raza tiene mucha importancia en la acumulación crónica de cobre son los perros, así hay razas de alto riesgo como el Bedlington Terrier que presenta una alteración hereditaria autosómica recesiva, la cual produce una disminución en la excreción biliar de cobre por un secuestro del metal en los lisosomas unido a metalotioneínas. Durante la última década, se observó un incremento en el número de razas puras susceptibles al cobre, incluyendo al Doberman Pinscher, West Highland White Terrier, Skye Terrier, Dálmata y más recientemente el Labrador Retriever (Cedeño et al., 2016). En ganado vacuno, sin embargo, la importancia del componente racial en el metabolismo de los elementos traza apenas se ha estudiado, y los datos que hay se refieren a un número muy limitado de razas. Por ejemplo en relación al cobre, se sabe que razas como la Simmental o la Charolesa presentan mayores necesidades que otras como la Angus (Radostits et al., 2010). Se ha propuesto, al igual que en el ovino, que las diferencias raciales en el metabolismo del cobre y por lo tanto en los requerimientos de los animales, podrían deberse principalmente a diferencias en la absorción del mineral a nivel intestinal, así como a la excreción biliar del mismo.

1.4.1. Ganado ovino

La influencia de la raza sobre la susceptibilidad a padecer procesos de deficiencia o toxicidad de cobre ha sido ampliamente estudiada en ganado ovino (Suttle, 2010), llevando a clasificar a los animales como tolerantes y/o resistentes, e incluso, hacer una selección racial específica que se adapte a las necesidades de cada región geográfica en concreto, permitiendo en muchos casos disminuir la incidencia de patologías asociadas tanto a la deficiencia de cobre (como la ataxia enzoótica o los problemas reproductivos), como al exceso o acumulación hepática de cobre.

Entre las diferentes razas de ovejas existen diferencias en la tolerancia al cobre (Woollians et al., 1982; van der Berg et al., 1983). Es el caso de la raza Texel que es de las más vulnerables a la toxicidad por cobre por su mayor retención de cobre en el hígado (Littledike y Young, 1993; Suttle et al., 2002); por el contrario aquellas caracterizadas por una pobre retención desarrollan deficiencia de cobre cuando el aporte es insuficiente, como es el caso de la raza escocesa Blackface (Woollians et al., 1986). Estas diferencias genéticas en el metabolismo de cobre en ganado ovino parecer estar asociadas en gran parte a diferencias en la absorción intestinal del cobre de la dieta (Woollians et al., 1983), aunque también pueden producirse por diferencias debidas al metabolismo y distribución del cobre absorbido (Woollians et al., 1982, 1983). La existencia de determinados genes que controlan las concentraciones plasmáticas de cobre ha quedado demostrada con éxito en la selección de líneas genéticas con niveles de cobre altos y bajos (dentro, incluso, de una misma raza), donde la herencia genética puede explicar un 0.3% de la variación normal de este oligoelemento (Radostits et al., 2010).

Así, Woolliams et al. (1982) demostró que el cruce entre ovejas Blackface y Texel Scottish retenían más del doble de cobre en hígado que los animales de raza pura Scottish Blackface (13.7% *versus* 5.6%). Esto parece deberse a diferencias en la eficacia de absorción por parte de ciertas razas en relación al cobre consumido.

Wiener et al. (1978) describieron que las ovejas Orkney, una raza que es altamente susceptible a la intoxicación por cobre, absorbían el cobre de la dieta más eficientemente que otras razas. La raza Blackface, una raza ovina que es resistente a la intoxicación por cobre, tenía una temprana saturación de la absorción de cobre comparada con la raza Welsh, una raza susceptible a dicha intoxicación, debido a que el rango máximo de absorción de cobre de la raza Blackface era menor que el de la raza Welsh. Varias investigaciones sugirieron que la diferencia en la excreción endógena de cobre también contribuyó a las diferencias genéticas en la retención de cobre a nivel hepático.

En un experimento realizado por Suttle et al. (2002) en el cual se utilizaron corderos de razas Suffolk, Texel y Charolais alimentados con una dieta que contenía una mezcla de minerales y sin adición de ningún antagonista de cobre, se observó que patrón de excreción de cobre de la raza Suffolk comenzó con valores bajos alcanzando una meseta a las 22 semanas de edad; en cambio en la raza Texel, los valores se incrementaron continuamente partiendo de un nivel inicial alto. La acumulación hepática de cobre varió significativamente con la raza, y la herencia genética puede explicar un 0.85% de la variación normal en la raza Suffolk. La alta concentración de

cobre en hígado en los corderos de raza Texel respecto a los corderos Suffolk confirma resultados previos obtenidos mediante cruzamientos de estas razas (Woolliams et al., 1982). Antes de este experimento, se creía (Weiner et al., 1978) o asumía (Woolliams et al., 1982 y 1985) que las variaciones raciales en el metabolismo del cobre eran debidas principalmente a la diferencia en la absorción intestinal de cobre. No obstante, los diferentes patrones de excreción de cobre del hígado para los corderos Texel y Suffolk observados en este estudio parecen explicar mejor las diferencias raciales en la acumulación hepática del cobre. Con respecto a la raza Charolais, no se pudo evaluar la excreción hepática de cobre por la limitación del número de animales en el estudio.

Woolliams et al. (1982) compararon la raza Texel con otras cinco razas, entre ellas la Suffolk, cruzadas con Scottish Blackface, alimentadas con una dieta con 12 o 20 mg Cu/kg materia seca. La actividad de las enzimas hepáticas (aspartato-aminotransferasa) indicó que el daño hepático fue mayor en el cruce con Texel que en el cruce con Suffolk, debido a la mayor acumulación de cobre en hígado. Además, se observó que la acumulación de cobre en hígado provoca una disminución del peso y tamaño de la víscera (Woolliams et al., 1982).

En otro estudio realizado por Simpson et al. (2004) se encontró que la raza North Ronaldsay es muy sensible al cobre ambiental sufriendo daños hepatocelulares con exuberante fibrosis e incipiente cirrosis. La raza Cambridge, por el contrario, demostró ser mucho más tolerante y acumular cobre más lentamente, sufriendo un cambio patológico en el hígado, pero sin demasiada fibrogénesis. Esta diferente respuesta patológica podría derivar de una diferente expresión de los componentes celulares constituyentes del hígado.

1.4.2. Ganado vacuno

A diferencia del ganado ovino, en ganado vacuno la información de la que se dispone es escasa y se refiere a un número más limitado de razas. Así por ejemplo, se ha indicado que ciertas razas como la Simmental y la Charolesa podrían tener mayores requerimientos de cobre que otras como la Aberdeen Angus (Radostits et al., 2010; Suttle, 2010). Smart (1984) observó que las novillas Simmental tenían concentraciones de cobre en plasma más bajas que las razas Hereford y Aberdeen Angus. De forma similar Ward et al. (1995) observaron que en ausencia de suplementación con cobre, los animales de raza Aberdeen Angus tienen mayores concentraciones de cobre plasmático que el ganado Simmental o Charolais. Mullis et al. (2003) en vacuno adulto suplementado con cobre y zinc, observó que los animales de raza Simmental mostraban un menor estatus de cobre que los de raza Aberdeen Angus, lo que sugiere unos mayores requerimientos de este mineral. A la hora de explicar las diferencias raciales en el metabolismo de cobre en ganado vacuno, y por tanto en las necesidades de cobre en dichos animales, se ha propuesto que pueden deberse, al igual que el ganado ovino, tanto a diferencias en la absorción de cobre a nivel intestinal, como en la excreción biliar del mismo. Así, en un estudio realizado por Gooneratne et al. (1994) empleando distintos tipos de dietas (con niveles altos y bajos de cobre, con o sin suplementos de molibdeno y azufre) se puso de manifiesto que la excreción biliar de cobre en la raza Simmental fue al menos dos veces la de la Aberdeen Angus para cualquier tipo de dieta,

lo que hace que esta raza esté especialmente predispuesta a sufrir procesos de deficiencia de este oligoelemento.

En un estudio posterior llevado a cabo en 2012 por Pogge et al. en el que se evaluó el metabolismo mineral en ganado Simmental y Angus tras la inyección de un complejo mineral (cobre, manganeso, selenio y zinc), se constató de nuevo que la raza Simmental tenía concentraciones plasmáticas de cobre, selenio y zinc menores que la Angus; mientras que la Simmental tenía mayores concentraciones de manganeso en hígado, lo que sugería diferencias en la excreción hepática de manganeso entre las dos razas.

Las diferencias observadas en los depósitos corporales de cobre entre razas también podrían estar asociadas a diferencias en la cantidad de alimento ingerido, siendo ésta muy variable y atendiendo a las necesidades fisiológicas de los animales. Du et al. (1996) observaron como al recibir la misma ración *ad libitum* rica en cobre, el ganado Jersey acumuló cobre en hígado un poco más rápido que el Holstein, aunque también es cierto que consumían más alimento por unidad de peso metabólico. Se encontraron además diferencias en la actividad de la ceruloplasmina, lactato deshidrogenasa y aspartato aminotransferasa. Este estudio fue la primera demostración de las diferencias genéticas en la concentración del cobre hepático dentro del vacuno de leche. Incluso aunque las vacas Jersey parecen ser más susceptibles a la intoxicación por cobre y tenían mayor cantidad de cobre plasmático que las Holstein (Gibson et al., 1987), las diferencias genéticas fueron asociadas a la deficiencia en la absorción de cobre de la dieta, la excreción de cobre endógeno y la cantidad de comida ingerida.

Morales et al. (2000), en otro estudio realizado con las mismas razas, encontraron un consumo de alimento más alto al inicio del estudio para las vacas de raza Holstein, si bien se igualaba al expresarlo como porcentaje del peso corporal. La concentración de cobre plasmático se vio incrementada por el consumo de dietas bajas en cobre, y su efecto fue mayor en vacas Holstein, causando una interacción de cobre y raza. Contrariamente, la concentración de cobre en leche fue más alta en la raza Jersey, y las dietas bajas en cobre disminuyeron esta concentración principalmente en Jersey con respecto a las Holstein. La depleción de cobre disminuyó el cobre en leche y esto llevó a los autores a pensar que la concentración de cobre en leche puede ser un indicador más agudo del estatus de cobre de los animales que el cobre en plasma.

Otras posibles explicaciones a la variación racial de los depósitos de cobre podrían situarse en las diferencias en el tamaño relativo del hígado y los estatus normales de otros oligoelementos, así por ejemplo, Littledike et al. (1995) han constatado que la raza Limousin acumula más cobre a nivel hepático tras largos periodos de suplementación, lo que podría explicarse teniendo en cuenta el tamaño pequeño del hígado así como unos mayores niveles de zinc hepático en comparación con otras razas de vacuno. En otro experimento, estos mismos autores evaluaron nuevamente la raza Limousin pero comparándola, en este caso, con la raza Piamontesa y Hereford, para observar el efecto de la raza sobre la concentración mineral en tejidos en ganado de carne. Nuevamente hallaron que la raza Limousin acumula más cobre en hígado que las otras razas (Piamontesa y Hereford). Los datos podrían implicar una mayor necesidad de minerales o una mayor eficiencia en el uso de los minerales de la dieta por parte de la raza Limousin. Estas investigaciones concluyeron que el ganado Limousin podía adaptarse mejor a un medioambiente donde el contenido de cobre sea limitante, como vimos

anteriormente. Finalmente los niveles de cobre en plasma fueron influenciados por la raza, las novillas Hereford tuvieron concentraciones de cobre plasmático más bajas que la raza Piamontesa.

En Galicia, en un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en animales alimentados sobre pastos abonados reiteradamente con purines de cerdo ricos en cobre se observó que la acumulación hepática de cobre en terneros de raza Frisona (92.7 ± 3.92 mg/kg) fue casi un 50% superiores a la raza Rubia Gallega (62.3 ± 2.99 mg/kg) y un 20% a la de los cruces de ambas razas (76.3 ± 2.88 mg/kg). Además, la raza Frisona presentó el mayor porcentaje de casos (42%) con niveles hepáticos de cobre por encima de los rangos de normalidad (>100 mg/kg peso fresco; Puls, 1994), frente al 27% en los cruces y al 13% en los terneros de raza Rubia Gallega. A nivel sanguíneo, los niveles de cobre mostraron el mismo patrón de distribución por razas, siendo en este caso las concentraciones sanguíneas de cobre en terneros de raza Frisona (0.906 ± 0.17 mg/l) un 18 y un 6% superiores a los de las razas Rubia Gallega (0.766 ± 0.13 mg/l) y los cruces de ambas (0.853 ± 0.12 mg/l) respectivamente (Miranda et al., 2006). No obstante, en este estudio a diferencia de los experimentos mencionados anteriormente, los animales no han estado sujetos a condiciones experimentales que permitiesen evaluar si las diferencias observadas se debían a un distinto nivel de absorción intestinal o excreción biliar o a diferencias en la cantidad de exposición a cobre en la dieta. Por ello, posteriormente se llevaron a cabo nuevos estudios en condiciones experimentales en los que se constataron estas diferencias raciales (Miranda et al., 2010a). Los terneros de raza Frisona (aptitud leche) acumularon niveles significativamente superiores de cobre en el hígado que los terneros de raza Rubia Gallega (aptitud carne), siendo la diferencia especialmente notable (61%) cuando se considera la capacidad de almacenamiento total en el hígado. Un 89% de los terneros frisonos acumularon niveles de cobre en hígado por encima de los rangos de toxicidad (150 mg/kg peso fresco). Se observó una correlación negativa entre el rendimiento de la canal y el ratio de la concentración de cobre en músculo e hígado, lo que parece indicar que los animales con mejor conformación de la canal (aptitud cárnica: Rubia Gallega) podrían necesitar una mayor movilización de cobre del hígado hacia el músculo, resultando en una menor acumulación de cobre en hígado (Miranda et al., 2010a). El hecho de que los cruces de ambas razas mantengan una posición intermedia apunta a que estas diferencias tengan un componente genético importante (Miranda et al., 2006; 2010a).

Existen otras investigaciones como las realizadas por Engle y Spears (2001) que intentaron determinar los efectos del cobre dietético sobre el rendimiento y el metabolismo lipídico en terneros Simmental. En dicho estudio, la suplementación de cobre a terneros Simmental tuvo mínimos efectos sobre el metabolismo de los lípidos. Esto contrasta con los efectos del cobre sobre el metabolismo lipídico observado en ganado de raza Aberdeen Angus y sus cruces con Hereford (Ward et al., 1995; Engle and Spears, 2000a, Engle et al., 2000a, b). Esta diferencia entre razas relacionada con los efectos del cobre sobre el metabolismo lipídico podría deberse a diferencias en el metabolismo de cobre entre las razas Simmental y Aberdeen Angus (Gooneratne et al., 1994; Ward et al., 1995), o bien a diferencias en el metabolismo lipídico entre razas. De hecho, estudios previos en las razas Aberdeen Angus y sus cruces con Hereford indican que la suplementación con cobre reduce el espesor de grasa dorsal sin alterar el marmolado de las carnes o incrementar los ácidos grasos poliinsaturados en músculo.

En un estudio en el que se evaluaron las diferencias en los niveles de oligoelementos en suero en cinco genotipos lecheros: F1 (cruce de Holstein x Jersey); Guernsey (G) (F1 x Guernsey); Montbeliarde (M) (F1 x Montbeliarde); Pardo Suizo (PS) (F1x Pardo Suizo) y Retrocruce (R) (G, M o PS, x Holstein) se observó que la raza M presenta niveles más altos de cobalto y de hierro en suero, las F1 tiene más cobre y menos manganeso y las G menos hierro y cobre que el resto de los genotipos (Mancuso, 2017).

1.5. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE ELEMENTOS TRAZA EN MÚSCULOS Y ÓRGANOS

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que las concentraciones de elementos traza no están uniformemente distribuidas a lo largo de la canal o entre órganos. Hasta la fecha, los estudios sobre la concentración de oligoelementos en las diferentes especies animales se centraron principalmente en determinar sus niveles en el hígado y el riñón y relacionarlos con el estatus sanitario y mineral de los animales bajo diferentes sistemas de producción y condiciones experimentales (García-Vaquero et al., 2011). En los últimos años también se describieron los patrones de acumulación de los oligoelementos en estos órganos. Por ejemplo, las diferencias en la acumulación de cadmio a nivel de la médula o la corteza renal (Olsson y Oskarsson, 2001), o las diferencias en la acumulación de cobre entre los diferentes lóbulos hepáticos (Miranda et al., 2010b) o las diferencias histológicas debidas a la diferente acumulación de cobre a nivel celular o subcelular (García-Vaquero et al., 2012). Existen pocos estudios sobre la acumulación de los oligoelementos en el tejido muscular y muchos se limitan a ciertos cortes musculares (García-Vaquero et al., 2011; McGilchrist et al., 2016) o incluso a un tejido muscular no especificado (Sedki et al., 2003; Oyaro et al., 2007).

La industria cárnica es un mercado en crecimiento, de hecho, el consumo de carne bovina en Europa ascendió a más de 10.5 kg per cápita en 2014. Tradicionalmente en la carne destinada al consumo humano solo se evaluaba la composición aproximada de sus macronutrientes (principalmente el contenido de humedad, proteínas y grasa). Recientemente ha adquirido más protagonismo el estudio de otras características de la carne como puede ser el perfil de ácidos grasos (Enser et al., 1998; Morán et al., 2013) o la concentración de oligoelementos, características interesantes de monitorizar porque dependen de múltiples factores como la raza, la edad del animal, el tipo de alimentación y las condiciones geográficas (Czerwonka y Szterk, 2015). Como anteriormente señalábamos, las concentraciones de elementos traza no están uniformemente distribuidas a lo largo de la canal. Aunque tradicionalmente era bien sabido que las concentraciones de hierro eran más altas en los músculos rojos, estudios recientes (Czerwonka and Szterk 2015; López-Alonso et al., 2016; McGilchrist et al., 2016) también indican que la mayoría de los oligoelementos varían significativamente a lo largo de la canal: los cortes de ternera que incluyen músculos con una alta proporción de fibras oxidativas de contracción lenta (músculos rojos) mostraron concentraciones de oligoelementos más altas que los cortes de ternera que incluyen músculos con fibras glicolíticas de contracción rápida (músculos blancos). Las carnes rojas magras desempeñan un papel importante en las dietas saludables y equilibradas debido a su alta cantidad de nutrientes. Además de ser un alimento rico en proteína y bajo en

carbohidratos, la carne roja contiene oligoelementos esenciales en concentraciones más altas y más absorbibles que otros alimentos. Especialmente importante es el papel del hierro para prevenir la anemia; zinc para el sistema inmunitario y la fertilidad, y las propiedades antioxidantes del selenio para reducir el riesgo de enfermedades cardíacas y ciertos tipos de cáncer (Biesalski, 2005; Cabrera et al., 2010; Mateescu et al., 2014). En un estudio reciente en el que se evaluaron las concentraciones de oligoelementos (cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, selenio y zinc) en 12 tipos de músculo en terneros de raza Rubia Gallega, se observó que los cortes de músculo con una alta proporción de fibras oxidativas lentas (diafragma y corazón) mostraron concentraciones de elementos traza significativamente superiores a los cortes con fibras glucolíticas rápidas (como el redondo o semitendinoso) (López-Alonso et al., 2016).

Además, las diferencias interraciales en las concentraciones de oligoelementos en la carne están bien documentadas en la literatura (Cabrera et al., 2010, Ramos et al., 2012, Pilarczyk, 2014, Duan et al., 2015, Domaradzki et al., 2016). Estudios recientes señalan que las concentraciones de minerales traza en el músculo están, al menos en parte, determinadas genéticamente (Morris et al., 2013; Mateescu et al., 2014; Mortiner et al., 2014) y que los genes implicados pueden actuar a través de proteínas receptoras, transportadoras y chaperones (Morris et al., 2013) y, curiosamente, las concentraciones de elementos traza están relacionadas con las principales propiedades organolépticas (Duan et al., 2015).

Estudios llevados a cabo por Holló et al. (2007), estudiando las razas Gris Húngara y Frisona-Holstein, y Duan et al. (2015), evaluando los terneros resultantes del cruzamiento por inseminación artificial de hembras de Angus con toros Hereford, Angus, Brangus, Beefmaster y Bonsmara, no encontraron diferencias entre razas en las concentraciones de oligoelementos en la carne, concretamente en el músculo *Longissimus dorsi*. Pilarczyk (2014) encontró concentraciones menores de cobre, hierro, manganeso y zinc en carne de toros de Charolais en comparación con Hereford y Simmental. De manera similar, Freitas et al. (2014) encontraron diferencias en las concentraciones de hierro y zinc, presentando los Hereford puros concentraciones más bajas de ambos elementos (tanto cuando se terminan en pasto como en cebaderos). Sin embargo, pocos estudios han evaluado el efecto de la raza en varios tipos de músculos o cortes de carne a través de la canal. Por ejemplo, Cabrera et al. (2014) estudiaron el contenido de cobre, hierro, manganeso, selenio y zinc en siete cortes de carne (solomillo, lomo, redondo, babilla, falda, morrillo y pecho) de terneros Hereford y Braford alimentados con pastos. Se observaron diferencias significativas a lo largo de la canal (la babilla mostró más cobre y zinc y menos hierro que la mayoría de los cortes de carne), pero no entre las razas o la interacción entre ambos. Más recientemente, Domaradzki et al. (2016) midieron cobre, hierro, manganeso y zinc en los músculos *Longissimus lumborum* y *Semitendinosus* de terneros de cinco razas en Polonia, y se encontraron diferencias significativas (excepto para manganeso) entre los músculos y las razas (pero no interacciones entre ambos factores). El músculo *Longissimus lumborum* mostró concentraciones significativamente más altas de cobre, hierro y zinc que el *Semitendinosus*. Para las razas observaron que la de aptitud de la leche (Frisona Polaca) mostró las concentraciones más altas de oligoelementos (excepto cobre) y la de

aptitud de carne (Simmental) las concentraciones más bajas (menos manganeso) de oligoelementos.

Las diferencias entre razas podrían estar relacionadas con diferencias en la masa muscular (mayor en las razas de aptitud cárnica) y en la actividad metabólica (mayor en las razas de aptitud láctea). Sin embargo, también es posible que las diferencias entre razas, en las concentraciones de elementos traza en la carne, pudieran estar relacionadas, al menos en parte, con diferencias en la composición muscular. La selección para un aumento de la musculatura en las especies animales de producción, ha mostrado un aumento de la proporción de las miofibras glicolíticas de contracción rápida tipo IIX en bovinos (Wegner et al., 2000). En este sentido es importante tener en cuenta la aptitud de los animales que condicionará el tipo de músculo, como ocurre en animales con carácter “culón” o doble musculatura, característica de muchas razas cárnicas. El fenómeno de doble musculatura se caracteriza por mutaciones que hacen que el gen de la miostatina sea inactivo, dando como resultado una hipertrofia muscular (Charlier et al., 1995, Grobet et al., 1997, 1998). Los animales de doble musculatura se caracterizan por una conformación excelente y un rendimiento de la canal extremadamente alto, coincidiendo con una reducción del tamaño de los órganos. En animales de doble musculatura, el número (y consecuentemente la proporción) de fibras glicolíticas rápidas se incrementa significativamente. Debido a la mayor proporción de fibras glicolíticas rápidas, los músculos de los animales de doble musculatura tienen un tamaño medio de fibra mayor que en los terneros normales (Batjoens et al., 1991, Uytterhaegen et al., 1994 y Gagnière et al., 1997) y se caracterizan por un alto contenido de glucógeno y una reducción en la mioglobina, el colágeno graso, la densidad capilar y el número de mitocondrias (Fiems, 2012). Esta última característica es altamente responsable de las concentraciones más bajas de oligoelementos observadas en los músculos glicolíticos rápidos (Deveaux y Cassar-Malek, 2001; Lefaucheur, 2010).

Por otra parte, la hipertrofia muscular en el ganado adulto con de doble musculatura no es uniforme en todo el cuerpo. Cuando se realizan comparaciones entre vacuno normal y con doble musculatura con un peso muscular constante, algunas regiones están hipertrofiadas, isotrofiadas e incluso hipotrofiadas. Esto depende de la cantidad de fibras tipo I (oxidativo), tipo IIA (oxidativo-glicolítico) e IIB (glicolítico) que hay en cada músculo (Hwang et al., 2010; McGilchrist et al., 2016).

1.6. METALOTIONEÍNAS Y FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

1.6.1. Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT) son unas proteínas que se aislaron por primera vez en 1957 en el riñón de caballos, como una proteína unida al cadmio (Margoshes y Vallee, 1957; Kagi y Vallee, 1960). Posteriormente se demostró, en animales de experimentación, que su síntesis podía ser estimulada por metales, y de ahí surgió el interés en investigar el papel de las metalotioneínas en la detoxificación del cadmio y otros metales pesados (Bremner y Beattie, 1990). Además de los elementos tóxicos las metalotioneínas también participan en el metabolismo de metales esenciales. Así, se

descubrió que estas metaloproteínas están mayoritariamente unidas a cobre y zinc en varios tejidos (Bremner y Young, 1976) y que su síntesis puede ser inducida por estos elementos esenciales (Webb, 1972; Bremner et al., 1978), además de por una gran variedad de estímulos fisiológicos, incluyendo el hambre y el estrés. Todos estos hallazgos ponen de manifiesto su importancia fisiológica, nutricional así como toxicológica y se sugiere que su papel en la detoxificación de metales tóxicos, como el cadmio, en realidad podría ser una coincidencia fortuita debido a las propiedades químicas similares entre el cadmio, cobre y zinc (Webb, 1972).

En cuanto a las propiedades físico-químicas de las metalotioneínas, Kagi y Vallee (1960) aislaron y caracterizaron estas proteínas en una gran variedad de muestras biológicas. Demostraron que estas metaloproteínas cuentan con una cadena polipeptídica única de 61 aminoácidos de los cuales el 25-30 % contienen residuos de cisteína, capaz de unir a 5-7 átomos de cobre por molécula y presentan una secuencia homóloga indicando la conservación de la estructura primaria a lo largo de la cadena evolutiva.

A la hora de estudiar el metabolismo hepático de las metalotioneínas no podemos olvidar su capacidad de fijación a elementos, tanto esenciales (cobre y zinc) como tóxicos (principalmente cadmio, aunque también mercurio o plata) puesto que van a determinar importantes interacciones entre estos metales, tanto a la hora de su síntesis, competencia por los puntos de fijación, como en su degradación (Bremner, 1987). En primer lugar debemos señalar la distinta afinidad de los distintos cationes por los grupos tiol de las metalotioneínas. En general se asume la siguiente secuencia de afinidad: $\text{Hg(II)} > \text{Cu(II)} > \text{Ag(I)} > \text{Bi(III)} > \text{Cd(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Zn(II)} > \text{Co(II)} > \text{Fe(II)}$. Se comprobó que el Cd^{+2} y el Hg^{+2} desplazan al Zn^{+2} de Zn-MT hepática en ratas in vivo y ex vivo; cuando el hígado era pre-inducido con cobre, cadmio y mercurio estos elementos podían desplazar al zinc de (Zn, Cu)-MT in vivo y ex vivo, pero al contrario de lo esperado el mercurio era incapaz de desplazar al cobre de las metalotioneínas. No obstante, debemos señalar que la unión de estos cationes a los puntos de fijación de las metalotioneínas no solo depende de su respectiva afinidad por los residuos de cisteína, sino que también está relacionada con su cantidad relativa en la célula (Hamilton et al., 1987). Estudios experimentales han demostrado que el cadmio y el cobre compiten por los sitios tiol de las metalotioneínas. Las metalotioneínas inducidas por el cadmio se van a unir con más facilidad al cadmio que al cobre (Foulkes, 1993). La capacidad de unión a las metalotioneínas va a depender de las concentraciones relativas de cada metal, de manera que si se presentan concentraciones de cadmio relativamente altas en relación a los ratios de cobre hepáticos se facilita el desplazamiento del cobre. Estas relaciones negativas entre el cadmio y el cobre hepático se observaron en ganado vacuno y ovino expuesto experimentalmente a cadmio o que procedía de zonas contaminadas (Miranda et al., 2005).

El cobre desplaza al zinc y al cadmio de la proteína (Bremner y Marshal, 1974) esto nos ayuda a explicar el desarrollo de una deficiencia de cobre en animales con dietas altas en zinc y cadmio. La distinta afinidad de varios metales por las metalotioneínas es también importante para comprender como es el ratio de degradación de la proteína en función del contenido del metal (Bremner y Mehra, 1983). La unión tan sólida de la metalotioneína al cobre se ilustra también por la incapacidad del EDTA para desplazar al cobre de la proteína, mientras que si es capaz de hacerlo en el caso del zinc y en

menor medida del cadmio. El tetratiomolibdato (TTM) es extremadamente efectivo en el desplazamiento del cobre de las metalotioneínas, lo cual permite explicar los efectos adversos del molibdeno en el metabolismo del cobre en rumiantes (Bremner y Mehra, 1983).

Las metalotioneínas han sido aisladas de una gran variedad de especies y tejidos animales, siendo más características del hígado, riñón e intestino, mostrándose en hígado de animales adultos como una proteína que contiene zinc (Nordberg, 1998). Uno de los escenarios más conocidos del papel de las metalotioneínas es en el metabolismo intrahepático del cobre, si bien tras muchos años de investigación su papel no está totalmente esclarecido. La unión del exceso de cobre a las metalotioneínas en el citosol, para posteriormente ser eliminado a través de los lisosomas vía biliar, parece ser la hipótesis más aceptada dentro de la detoxificación celular de este metal (Bremner, 1987). De hecho, está demostrado que en el hígado de animales expuestos a altos niveles de cobre se encuentran cantidades importantes de complejos cobre-metalotioneínas en los lisosomas y otras fracciones hepáticas (Johnson et al., 1981; Mehra y Bremner, 1984). Así, la rápida desaparición del cobre del citosol reflejaría la absorción de la Cu-metalotioneína por los lisosomas y otras organelas para su posterior eliminación biliar. Sin embargo, el hecho de que no se detecten anomalías en el metabolismo del cobre a nivel hepático en animales deficientes de zinc (en los cuales las metalotioneínas unidas al cobre están ausentes) parecen indicar que la metaloproteína no juega un papel obligatorio en el transporte intracelular del cobre (Bremner, 1987).

Las grandes diferencias entre especies animales en cuanto a su capacidad de síntesis de metalotioneínas, podrían explicar la diferencia de susceptibilidad a la acumulación de cobre y subsiguiente toxicidad. De hecho la toxicidad por cobre es baja en aquellas especies como el cerdo donde una gran parte de cobre está ligado a metalotioneínas a nivel citosólico, y por el contrario, es muy alta en otras como la oveja en las que solamente una pequeña proporción de cobre está ligado de esta forma (Bremner, 1987; Bremner y Beattie, 1990).

En casos concretos como cerdos en crecimiento (Mehra y Bremner, 1984) o determinadas razas de perros como los Bedlington terriers o los Doberman pinscher (Johnson et al., 1981), que presentan un defecto inherente en el metabolismo de cobre que conlleva a una acumulación excesiva de este metal, o en el hígado de humanos con un cierto tipo de enfermedad colestática, la mayor parte del cobre está unido a metalotioneínas del citosol, de lisosomas y otras porciones particuladas. En contraste, ovejas con acúmulo de cobre a nivel hepático (Mehra y Bremner, 1984), ratas alimentadas con suplementos de cobre y animales deficientes de zinc de muchas especies animales muestran tan sólo una pequeña porción de cobre asociado a metalotioneínas.

1.6.2. Fraccionamiento subcelular

Estudios de fraccionamiento subcelular llevados a cabo principalmente por técnicas de centrifugación diferencial (Corbett et al., 1978; Gooneratne et al., 1979; Saylor y Leach, 1980; Jenkins, 1989; Kumaratilake y Howell, 1989) consideran que en las células hepáticas los metales están en cuatro grandes fracciones, desempeñando unas funciones específicas en cada una de ellas:

- *Fracción microsomal*. Contiene al menos un 10% del contenido total del metal en la célula hepática y representa las fracciones del retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso, aparato de Golgi y ribosomas. Está involucrada en la nueva síntesis de proteínas que contienen cobre que están siendo transportadas con el fin de su uso o secreción.
- *Fracción nuclear*. Contiene aproximadamente el 20 % el contenido total del metal en la mayoría de los mamíferos, si bien su contenido exacto es difícil de evaluar puesto que en esta fracción queda además englobado el cobre unido a restos de tejidos y células intactas. Se considera una organela que puede funcionar como un almacén temporal. Está constituido por ácido nucleico y proteínas básicas a las cuales se une el cobre.
- *Fracción granular*. En la mayor parte de los animales con un estatus adecuado representa el 20% del contenido total del metal. Está compuesta por mitocondrias y lisosomas, éstos últimos con un papel vital para mantener la homeostasis del cobre. El material que no puede ser digerido o preparado para su excreción por el parénquima es almacenado dentro de los lisosomas, organelas que secuestran el exceso de cobre previa excreción biliar.
- *Citosol*. El sobrenadante final o citosol contiene la mayoría del contenido total del metal en hígado en los mamíferos adultos. Está asociado en su mayor parte a proteínas específicas metal-afines como las metalotioneínas (principales puntos de almacenamiento temporal de cobre en la célula) aunque en menor medida también a enzimas cobre-dependientes como la superóxido dismutasa.

1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacha F. 2002. Nutrición, Patología Digestiva y Salud Intestinal. XVIII Curso De Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Eds.: P.G. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. pp: 143-159.

Batjoens P, Fiems LO, Van Hoof J, Van Vooren T, Vereecke D. 1991. Myofibre composition and metabolic aspects in different strains of Belgian white-blue bulls and their relation to meat colour. In: Proceedings of the 37th International Congress of Meat Science and Technology, Kulmbach, Germany, 1-6 September 1991. pp: 324-327.

Biesalski HK. 2005. Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? Meat Science. 70: 509-524.

Blanco-Penedo I, Cruz J, López-Alonso M, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito J. 2006. Influence of copper status on the accumulation of toxic and essential metals in cattle. Environment International. 32: 901-906.

Blanco-Penedo I, Shore R, Miranda M, Benedito J, López-Alonso M. 2009. Factors affecting trace element status in calves in NW Spain. Livestock Science. 123: 198-208.

Bremner I, Beattie JH. 1990. Metallothionein and the trace minerals. Annual Review of Nutrition. 10: 63-83.

Bremner I, Hoekstra WG, Davies NT, Young BW. 1978. Effect of zinc status of rats on the synthesis and degradation of copper induced metallothionein. Biochemical Journal. 174: 883-892.

- Bremner I, Marshall RB. 1974. Hepatic copper-and zinc-binding proteins in ruminants. 2. Relationship between Cu and Zn concentrations and the occurrence of a metallothionein-like fraction. *British Journal of Nutrition*. 32: 293-299.
- Bremner I, Mehra RK. 1983. Metallothionein: some aspects of its structure and function with special regard to its involvement in copper and zinc metabolism. *Chemica Scripta*. 21: 117-121.
- Bremner I, Young BW. 1976. Isolation of (Copper, Zinc)-th pig liver. *Biochemical Journal*. 155: 631-635.
- Bremner I. 1987. Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *Journal of Nutrition*. 117: 19-29.
- Cabrera MC, Ramos A, Saadoun A, Brito G. 2010. Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. *Meat Science*. 84: 518-528.
- Cabrera MC, Saadoun A. 2014. An overview of the nutritional value of beef and lamb meat from South America. *Meat Science*. 98: 435-44.
- Cedeño Y, López-Alonso M, Miranda M. 2016. Hepatic concentrations of copper and other metals in dogs with and without chronic hepatitis. *Journal of Small Animal Practice*. 57(12): 703-709.
- Charlier C, Coppieters W, Farnir F, Grobet L, Leroy PL, Michaux C, Mni M, Schwes A, Vanmanshoven P, Hanset R, Georges M. 1995. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mammalian Genome*. 6: 788-792.
- Close WH. 2006. Trace mineral nutrition of pigs. Meeting production and environmental objectives. EAAP Annual Meeting: Antalya, Turkey.
- Corbett WS, Saylor WW, Long TA, Leach RM. 1978. Intracellular distribution of hepatic copper in normal and copper-loaded sheep. *Journal of Animal Science*. 47: 1174-1179.
- Czerwonka M, Szterk A. 2015. The effect of meat cuts and thermal processing on selected mineral concentration in beef from Holstein-Friesian bulls. *Meat Science*. 105: 75-80.
- Deveaux V, Cassar-Malek I, Picard P. 2001. Comparison of contractile characteristics of muscle from Holstein and Double-Muscled Belgian Blue fetuses. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 131: 21-29.
- Domaradzki, P., Florek, M., Staszowska, A., Litwińczuk, Z. 2016. Evaluation of the Mineral Concentration in Beef from Polish Native Cattle. *Biological Trace Element Research*, 171(82): 328-332.
- Du Z, Hemken RW, Harmon RJ. 1996. Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulphate or copper proteinate. *Journal of Dairy Science*. 79: 1873-1880.
- Duan Q, Tait Jr RG, Schneider MJ, Beitz DC, Wheeler TL, Shackelford SD, Cundiff LV, Reecy JM. 2015. Sire breed effect on beef longissimus mineral concentrations and their relationships with carcass and palatability traits. *Meat Science*. 106: 25-30.
- Engle TE, Spears JW. 2000a. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. *Journal of Animal Science*. 78: 2446-2451.
- Engle TE, Spears JW. 2000b. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *Journal of Animal Science*. 78: 2452-2458.

Engle TE, Spears JW. 2001. Performance, carcass characteristics and lipid metabolism in growing and finishing Simmental steers fed varying concentrations of copper. *Journal of Animal Science*. 79: 2920-2925.

Enser M, Hallett KG, Hewett B, Fursey GAJ, Wood JD, Harrington G. 1998. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science*. 49(3): 329-41.

Fiems, LO. 2012. Double Muscling in Cattle: Genes, Husbandry, Carcasses and Meat. *Animals*. 2 (3): 472.

Foulkes EC. 1993. Metallothionein and glutathione as determinants of cellular retention and extrusion of cadmium and mercury. *Life Science*. 52: 1617-1620.

Freitas De AK, Lobato JF, Cardoso LL, Tarouco JU, Vieira RM, Dillenburg DR, Castro I. 2014. Nutritional composition of the meat of Hereford and Braford steers finished on pastures or in a feedlot in southern Brazil. *Meat Science*. 96(1): 353-360.

Gagnière H, Picard B, Jurie C, Geay Y. 1997. Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-muscled cattle. *Meat Science*. 45: 145-152.

Garcia-Vaquero M, Benedito JL, Lopez-Alonso M, Miranda M. 2012. Histochemistry evaluation of the oxidative stress and the antioxidant status in Cu-supplemented cattle. *Animal*. 6(9): 1435-1443.

García-Vaquero M, Miranda M, Benedito JL, Blanco-Penedo I, López-Alonso M. 2011. Effect of type of muscle and Cu supplementation on trace element concentrations in cattle meat. *Food and Chemical Toxicology*. 49(6): 1443-1449.

Gibson DM, Kennelly JJ, Mathison GW. 1987. The performance of dairy and feedlot cattle fed sulphur dioxide-treated high-moisture barley. *Canadian Journal of Animal Science*. 68: 471-482.

Gooneratne SR, Howell J.McC, Gawthorne J. 1979. Intracellular distribution of copper in the liver of normal and copper loaded sheep. *Research in Veterinary Science*. 27: 30-37.

Gooneratne SR, Symonds HW, Bailey JV, Christensen DA. 1994. Effects of dietary copper, molybdenum and sulphur on biliary copper and zinc excretion in Simmental and Angus cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. 74: 315-325.

Grobet L, Royo Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. 1997. A deletion in the myostatin gene causes double muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*. 17: 71-74.

Hamilton SJ, Mehrle PM, Jones JR. 1987. Evaluation of metallothionein as a biological indicator of stress from cadmium on brook trout. *Transactions of the American Fisheries Society*. 116: 551-560.

Herdt TH, Hoff B. 2011. The use of blood analysis to evaluate trace mineral status in ruminant livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 27: 255-283.

Holló G, Nuernberg K, Holló I, Csapó J, Seregi J, Repa I, Ender K. 2007. Effect of feeding on the composition of longissimus muscle of Hungarian Grey and Holstein Friesian bulls. III Amino acid composition and mineral content. *Archiv Tierzucht*. 50(6): 575-586.

Hwang YH, Kim GD, Jeong JY, Hur SJ, Joo ST. 2010. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Science*. 86: 456-461.

Johnson GF, Morell R, Stockert RJ. 1981. Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis. *Hepatology*. 1: 243-248.

Kagi JHR, Vallee BL. 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal Biological Chemistry*. 235: 3460-3465.

Kumaratilake JS, Howell J.McC. 1989. Intracellular distribution of copper in the liver of copper-loaded sheep--a subcellular fractionation study. *Journal of Comparative Pathology*. 101 (2): 161-76.

Littledike ET, Wittum TE, Jenkins TG. 1995. Effect of breed, intake and carcass composition on the status of several macro and trace minerals of adult beef cattle. *Journal of Animal Science*. 73: 2113-2119.

Littledike ET, Young LD. 1993. Effect of sire and dam breed on copper status of fat lambs. *Journal of Animal Science*. 71(3): 774-778.

López-Alonso M, Montaña FP, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL. 2004. Interactions between toxic (As, Cd, Hg and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain. *BioMetals*. 17: 389-397.

Lopez-Alonso M, Miranda M, Blanco Penedo I. 2011. Potentials and Limitations of Husbandry Practice in Sustainable Systems to Secure Animals Mineral Nutrition. In: *Agricultural Research Updates*. Volume 2. Ed. Hendriks, B.P. Nova Science Publishers.

López-Alonso M, Miranda M. 2012. Implications of excessive livestock mineral supplementation on environmental pollution and human health. In: *Trace Elements: Environmental Sources, Geochemistry and Human Health*. Ed. DA De Leon, PR Aragon. pp: 40-53. Nova Science Publishers.

López-Alonso M. 2012. Trace Minerals and Livestock: Not Too Much Not Too Little. *ISRN Veterinary Science*. Article ID 704825, 18 pages. doi:10.5402/2012/704825.

López-Alonso M, Miranda M, Benedito JL, Pereira V, García-Vaquero M. 2016. Essential and toxic trace element concentrations in different commercial veal cuts in Spain. *Meat Science*. 121: 47-52.

Mancuso W. 2017. Evaluación y comparación de grupos genéticos lecheros en un sistema a pastoreo de la Comarca Lechera de Entre Ríos, Argentina. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.

Margoshes M, Vallee BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*. 79: 4813-4814.

Mateescu RG, Garmyn AJ, Tait RG, Duan Q, Liu Q, Mayes MS, Garrick DJ, van Eenennaam AL, Van Overbeke DL, Hilton GG, Beitz DC, Reecy JM. 2013. Genetic parameters for concentrations of minerals in longissimus muscle and their associations with palatability traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*. 91: 1067-1075.

McGilchrist P, Greenwood PL, Pethick DW, Gardner GE. 2016. Selection for increased muscling in Angus cattle did not increase the glycolytic potential or negatively impact pH decline, retail colour stability or mineral content. *Meat Science*. 114: 8-17.

Mehra RK, Bremner I. 1984. Species differences in the occurrence of copper-metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper-loaded animals. *Biochemical Journal*. 219(2): 539-546.

Miranda M, López Alonso M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL. 2005. Effects of moderate pollution on toxic and trace metal levels in calves from a polluted area of northern Spain. *Environment International*. 31: 543-548.

Miranda M, Cruz JM, López-Alonso M, Benedito JL. 2006. Variations in liver and blood copper concentrations in young beef cattle raised in north-west Spain: associations with breed, sex, age and season. *Animal Science* 82(2): 253-258.

Miranda M, Gutiérrez B, Benedito JL, Blanco-Penedo I, García-Vaquero M, López-Alonso M. 2010a. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Archives of Animal Nutrition*. 64 (2): 98-110.

Miranda M, Benedito JL, Gutiérrez B, García-Vaquero M, Blanco-Penedo I, López-Alonso M. 2010b. The interlobular distribution of copper in the liver of beef calves on a high-copper diet. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22(2): 277-81.

Morales MS, Palmquist DL, Weiss W.P. 2000. Effects of Fat Source and Copper on Unsaturations of Blood and Milk Triacylglycerol Fatty Acids in Holstein and Jersey Cows. *Journal of Dairy Science*. 83: 2105-2111.

Morán L, Giráldez FJ, Panseri S, Aldai N, Jordán MJ, Chiesa LM. 2013. Effect of dietary carnosic acid on the fatty acid profile and flavour stability of meat from fattening lambs. *Food Chemistry*. 138(4): 2407-14.

Morris CA, Bottema CD, Cullen NG, Hickey SM, Knowles SO, Pitchford WS. 2013. Effects of quantitative trait loci and the myostatin locus on trace and macro elements (minerals) in bovine liver, muscle and kidney. *Animal Genetics*. 44: 361-8.

Mortimer SI, van der Werf JHJ, Jacob RH, Hopkins DL, Pannier L, Pearce KL, Gardner GE, Warner RD, Geesink GH, Hocking Edwards JE, Ponnampalam EN, Ball AJ, Gilmour AR, Pethick DW. 2014. Genetic parameters for meat quality traits of Australian lamb meat. *Meat Science*. 96: 1016-1024.

Mulhern SA, Koller LD. 1988. Severe or marginal copper deficiency results in a graded reduction of the mimine status in mice. *Journal of Nutrition*. 118: 1041-1047.

Mullis LA, Spears JW, McCraw RL. 2003. Effects of breed (Angus vs Simmental) and copper and zinc source on mineral status of steers fed high dietary iron. *Journal of Animal Science*. 81(1): 318-322.

Nordberg M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*. 46: 243-254.

NRC (National Research Council). 2016. Nutrient requirements of beef cattle, eighth revised edn. (National Academy Press, Washington, DC.

Olsson M, Oskarsson A. 2001. Sampling of kidneys from cattle and pigs for cadmium analysis. *Analyst*. 126(1): 114-20.

Oyaro N, Juddy O, Murago EN, Gitonga E. 2007. The contents of Pb, Cu, Zn and Cd in meat in Nairobi, Kenya. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 5(3/4): 119.

Petersen MK. 1999. Considerations in trace mineral supplementation. Beef cattle handbook, BCH-5455. Product of Extension Beef Cattle Resource Committee, [http://www1.foragebeef.ca/\\$foragebeef/frgebeef.nsf/all/ccf1019/\\$FILE/traceminera%20considerations.pdf](http://www1.foragebeef.ca/$foragebeef/frgebeef.nsf/all/ccf1019/$FILE/traceminera%20considerations.pdf).

Pilarczyk R. 2014. Concentrations of toxic and nutritional essential elements in meat from different beef breeds reared under intensive production systems. *Biological Trace Element Research*. 158: 36-44.

Pogge DJ, Richter EL, Drewnoski ME, Hansen SL. 2012. Mineral concentrations of plasma and liver after injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle. *Journal of Animal Science*. 90: 2692-2698.

Puls R. 1994. *Mineral Levels in Animal Health*. Sherpa International, Clearbrook, British Columbia, Canada.

Radostits OM, Blood DC, Henderson JA. 2010. *Veterinary Medicine*, 8th Ed., Bailliere & Tindall Publication, Ltd., London.

Saylor WW, Leach RM. 1980. Intracellular distribution of copper and zinc in sheep: effect of age and dietary levels of the metals. *Journal of Nutrition*. 110: 448-459.

Sedki A, Lekouch N, Gamon S, Pineau A. 2003. Toxic and essential trace metals in muscle, liver and kidney of bovines from a polluted area of Morocco. *The Science of the Total Environment*. 317(1): 201-205.

Smart ME. 1984. Factors influencing plasma and liver copper and zinc in beef cattle. *Desertion, Saskatchewan, University of Saskatchewan*.

Suttle NF, Lewis RM, Small NW. 2002. Effects of breed and family on rate of copper accretion in the liver of purebred Charollais, Suffolk and Texel lambs. *Animal Science*. 75: 295-302.

Suttle NF. 2010. *Mineral nutrition of livestock*. 4th edn. Cabi Publishing, Wallingford.

Uytterhaegen L, Claeys E, Demeyer D, Lippens M, Fiems LO, Boucqué CV, Van de Voorde G, Bastiaens A. 1994. Effects of double-muscling on carcass quality, beef tenderness and myofibrillar protein degradation in Belgian Blue White bulls. *Meat Science*. 38: 255-267.

Van der Berg R, Levels FH, van der Schee W. 1983. Breed differences in sheep with respect to the accumulation of copper in the liver. *Veterinary Quarterly*. 5: 26-31.

Ward JD, Spears JW, Gengelbach GP. 1995. Differences in Copper Status and Copper Metabolism among Angus, Simmental and Charolais Cattle. *Journal of Animal Science*. 73: 571-577.

Webb M. 1972. Binding of cadmium ions by rat liver. *Biochemical Pharmacology*. 2751-2765.

Wegner J, Albrecht E, Fiedler I, Teuscher F, Papstein HJ, Ender K. 2000. Growth and reed related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*. 78: 1485-1496.

Wiener G, Suttle NF, Field AC, Herbert JG, Woolliams J.A. 1978. Breed differences in copper metabolism in sheep. *The Journal of Agricultural Science*. 91: 433-441.

Woolliams JA, Suttle NF, Wiener G, Field AC, Woolliams C. 1982. The effect of breed of sire on the accumulation of copper in lambs with particular reference to copper toxicity. *Animal Production*. 35: 299-307.

Woolliams JA, Suttle NF, Wiener G, Field AC, Woolliams C. 1983. The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content. *The Journal of Agricultural Science*. 100: 441-449.

Woolliams JA, Wiener G, Woolliams C, Suttle NF. 1985. Retention of copper in the liver of sheep genetically selected for high and low concentrations of copper in plasma. *Animal Production*. 41: 219-226.

Woolliams JA, Woolliams C, Suttle NF, Jones DG, Wiener G. 1986. Studies on lambs from lines genetically selected for low and high copper status. 1 .Differences in mortality. *Animal Production*. 43: 293-301.



Objetivos





2. OBJETIVOS

1. Analizar las concentraciones de elementos traza en sangre y tejidos en las principales razas utilizadas en la producción de carne en el norte de España (Frisona [HF], Rubia Gallega [RG] y sus cruces [RGxHF]) criados en intensivo con una suplementación mineral estándar de la dieta. Nuestra hipótesis es que los terneros de raza Frisona (HF) utilizados para la producción de carne necesitarán niveles más bajos de suplementación de elementos traza debido a una menor masa muscular.

2. Evaluar las concentraciones de los elementos traza en varios músculos con diferente perfil oxidativo/glicolítico (diafragma: típico oxidativo, trapecio: oxidativo/glicolítico intermedio y semimembranoso: típico glicolítico) en una raza de aptitud láctea (Frisona: HF); una raza de aptitud cárnica (Rubia Gallega: RG) y sus cruces (RGxHF). Debido a la alta concentración de elementos traza y a su estructura particular (fibras lentas α -cardiacas) el músculo cardíaco también se incluyó en el estudio.

3. Determinar si el patrón de acumulación subcelular de Cu en hígado explica la mayor acumulación hepática de Cu observada en Frisona (HF) en relación a la Rubia Gallega (RG). Para ello, se evaluará el papel de las metalotioneínas (MT) en la unión de Cu y se analizará la distribución subcelular del Cu en los diferentes compartimentos hepáticos en Frisona (HF), Rubia Gallega (RG) y sus cruces (RGxHF).



Capítulos





3.1

Influencia de la raza (leche o carne) sobre la concentración de elementos traza en terneros criados en intensivo para la producción de carne

Adaptado de:

Pereira V, Carbajales P, López-Alonso M and Miranda M. 2017. Effect of breed (dairy or beef) on trace element concentrations in cattle reared intensively for meat production. *Biological Trace Element Research*.

RESUMEN

Hasta hace unos años, las dietas animales se suplementaban con minerales en concentraciones muy por encima de sus necesidades fisiológicas. Sin embargo, la preocupación por el medio ambiente ha llevado a un mejor ajuste de la suplementación de minerales en función de las necesidades fisiológicas reales. En este contexto, la consideración de las diferencias relacionadas con la raza en las necesidades de oligoelementos es un factor a tener en cuenta. El objetivo de este estudio fue analizar las concentraciones de oligoelementos en las principales razas de vacuno utilizadas para la producción de carne en intensivo en el norte de España: Rubia Gallega (RG), Frisona (HF), y el cruce de ambas razas (RGxHF). Se sacrificaron 10 terneros de cada raza a los 10 meses de edad en matadero y se obtuvieron muestras de sangre, hígado, riñón, bazo, cerebro y músculo. En general, las concentraciones de elementos traza en el suero y en los órganos se encontraban dentro de los niveles adecuados en todos los terneros, lo que sugiere que la suplementación de minerales traza fue adecuada en todos los grupos. La única excepción a esto fue el cobre, las concentraciones de cobre en hígado fueron superiores a los niveles adecuados (25-100 mg/kg de peso fresco) en todos los terneros. Esto fue particularmente evidente en los terneros HF, superándose el nivel máximo recomendado para el consumo humano (140 mg/kg de peso fresco) en el 90% de estos animales. Las concentraciones de cobre, hierro, manganeso, selenio y zinc en el músculo fueron significativamente más altas en HF que en los terneros RG. Los cruces de ambas razas mantuvieron una posición intermedia. Estas diferencias relacionadas con la raza en las concentraciones de elementos traza en el músculo pueden estar relacionadas con una menor masa muscular y/o una mayor actividad hepática en los terneros HF (de leche) que en los terneros RG (de carne). Como la carne es una fuente esencial de oligoelementos altamente disponibles en las dietas humanas, las diferencias relacionadas con la raza en las concentraciones de oligoelementos en la carne merecen más investigación.

Palabras clave: elementos traza, raza, ganado vacuno, sistemas intensivos, tejidos

1. INTRODUCCIÓN

Los elementos traza u oligoelementos son requeridos para el funcionamiento normal de todos los procesos bioquímicos en el organismo. Forman parte de numerosas enzimas e intervienen en numerosos procesos biológicos y, por consiguiente, son esenciales para mantener la salud y la productividad de los animales (Suttle, 2010).

Los elementos traza deben ser proporcionados al ganado en concentraciones óptimas según sus necesidades, que varían en función del grado de crecimiento, desarrollo y ciclo de producción. No obstante, teniendo en cuenta la variabilidad individual en los contenidos de minerales en la materias primas que componen los piensos, así como las diferencias en la biodisponibilidad y las interacciones con otros nutrientes (principalmente otros oligoelementos), la suplementación recomendada incluye un factor de seguridad adicional para asegurar que la demanda promedio de la población se cubre (NRC, 2016). En la práctica, esto es factible porque, en la mayoría de los casos, las concentraciones dietéticas de oligoelementos pueden formularse con

grandes márgenes de seguridad, de modo que la ingesta puede exceder los requerimientos sin representar un riesgo para la salud animal (López-Alonso y Miranda, 2012). De hecho, generalmente se supone que la suplementación adecuada de minerales traza es barata y de sobra se compensan los costos adicionales de un posible exceso (Petersen, 1999). Sin embargo, en los últimos años ha surgido una preocupación en la Unión Europea por el ajuste de la suplementación mineral a las necesidades fisiológicas reales, ya que grandes cantidades de oligoelementos (principalmente Cu y Zn) se acumulan en el medio ambiente como consecuencia de la suplementación animal por encima de las necesidades nutricionales (EFSA, 2014, 2016). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomendó muy recientemente que se reduzcan los niveles máximos de cobre en piensos para bovinos de 35 a 30 mg/kg (EFSA, 2016). Para poder ajustar la suplementación de oligoelementos a las necesidades nutricionales reales, debemos tener en cuenta las diferencias en las necesidades que pueden tener las diferentes razas (Pogge et al., 2012). Los rumiantes, particularmente los ovinos, muestran grandes diferencias entre razas en el metabolismo del cobre, tanto en las necesidades como en el grado de tolerancia (Suttle et al., 2002), y pueden ocurrir episodios de deficiencia de cobre o acumulación hepática excesiva incluso cuando los animales reciben concentraciones dietéticas de cobre dentro de los límites establecidos en la legislación europea (Commission Regulation 1334/2003/EC). Así por ejemplo, la mayor acumulación de cobre en hígado observada en terneros de raza Frisona (aptitud leche) en comparación con terneros de raza Rubia Gallega (aptitud carne) cuando se crían en cebadero, con suplementación estándar de elementos traza, para la producción de carne puede estar relacionada con una menor movilización de cobre hacia el músculo en los terneros de aptitud láctea que tienen menor masa muscular (Miranda et al., 2010).

El objetivo del presente estudio fue analizar las concentraciones de elementos traza en sangre y tejidos en las principales razas utilizadas en la producción de carne en el norte de España (Frisona [HF], Rubia Gallega [RG] y sus cruces [RGxHF]) criados en intensivo con una suplementación mineral estándar de la dieta. Nuestra hipótesis es que los terneros HF utilizados para la producción de carne necesitaran niveles más bajos de suplementación de elementos traza debido a una menor masa muscular.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales de estudio

Para realizar el presente estudio se recogieron muestras de sangre, hígado, riñón, bazo, cerebro y músculo de 10 terneros de las razas Frisona (HF), Rubia Gallega (RG) y sus cruces (RGxHF) en el momento del sacrificio en un matadero a los 10 meses de edad. Los animales se seleccionaron aleatoriamente de un lote mayor (n= 356) criado en idénticas condiciones en un cebadero comercial en el noroeste de España. Una vez destetados, los terneros fueron alimentados con una dieta típica de terneros de cebo basada en pienso (e incluyendo un suplemento estándar de elementos traza) hasta el sacrificio. Los detalles de los ingredientes y la composición nutricional de la dieta se muestran en la **Tabla 1**. A los terneros se les permitió libre acceso al pienso, al agua y la paja de cebada. La ingesta diaria media de paja de cebada fue de aproximadamente 1 kg/animal. Los parámetros de rendimiento se registraron durante todo el ciclo productivo (**Tabla 2**).

Tabla 1. Ingredientes y composición química de las dietas aportadas en el estudio.

Ingredientes (% MS: materia seca)	
Maíz	30
Cebada	22.1
Harina soja (44% PB)	16.7
Gluten feed de maíz	6.9
Salvado de trigo	8
Cascarilla de soja	10
Melazas	1
Aceite de palma	1.5
Vitaminas/mineral premix*	3.2
Bicarbonato de sodio	0.6
Composición química (% MS: materia seca)	
Proteína bruta (PB)	15
Fibra bruta(FB)	7.3
Fibra neutro detergente(FND)	20.8
Fibra ácido detergente (FAD)	11.1
Extracto éter (EE)	3.5
Almidón	31.1
Cenizas	5.8

* Vitaminas y mineral premix contiene (per kg MS premix): 10.000 IU vitamina A, 2000 IU vitamina D, 25 mg vitamina E, 0.3 mg Co, 16 mg Cu, 32 mg Fe, 0.5 mg I, 40 mg Mn, 0.1 mg Se and 32 mg of Zn

2.2. Recogida de muestras

Las muestras de sangre (de la vena coccígea) se recogieron antes del sacrificio en tubos Vacutainer sin aditivos. Inmediatamente después del sacrificio, se recogieron de cada animal muestras de los órganos (hígado, riñón (médula y corteza), bazo y cerebro) y músculo (semitendinoso). Se registraron los pesos del hígado, riñón, bazo y el de la canal (**Tabla 2**). Todas las muestras fueron inmediatamente refrigeradas y transportadas al laboratorio. Dentro de las 6 horas de recogida, el suero se obtuvo por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos. Los órganos y el músculo se limpiaron de tejido conectivo y grasa. De cada muestra se obtuvieron 3 submuestras, tanto de suero (2 ml) como de tejidos (aproximadamente 10 g) que se congelaron a -20°C hasta el análisis.

Tabla 2. Parámetros zootécnicos por razas (medias \pm desviación estándar)

	Frisona (HF)	RG x HF	Rubia Gallega(RG)
Peso vivo inicial (kg)	129 \pm 21	133 \pm 19	143 \pm 28
Peso vivo final (kg)	401 \pm 40	399 \pm 31	402 \pm 29
Ingesta diaria (kg/d)	8.77 ^a	8.06 ^{ab}	7.45 ^b
Ganancia media diaria (GMD) (kg/d)	1.62	1.58	1.54
Conversión alimento	5.41 ^a	5.10 ^{ab}	4.84 ^b
Peso canal (kg)	202 \pm 21 ^a	231 \pm 22 ^{ab}	244 \pm 22 ^b
Rendimiento canal (%)	50.4 \pm 1.21 ^a	57.9 \pm 2.31 ^b	60.7 \pm 2.88 ^c
Peso hígado (kg)	6.28 \pm 0.91 ^a	5.45 \pm 0.38 ^b	4.94 \pm 0.60 ^b
Peso riñón (kg)	0.571 \pm 0.044 ^a	0.488 \pm 0.039 ^b	0.417 \pm 0.051 ^c
Peso corazón (kg)	1.68 \pm 0.24 ^a	1.56 \pm 0.14 ^b	1.51 \pm 0.17 ^b
Peso bazo (kg)	0.822 \pm 0.129	0.693 \pm 0.113	0.747 \pm 0.119

Diferentes letras indican diferencias significativas entre razas ($p < 0.05$).

2.3. Análisis de las muestras

Las muestras de suero (2 ml) se procesaron añadiendo primero 2,5 ml de ácido nítrico al 69% durante 1 h (digestión en frío) y luego se añadieron 0,5 ml de peróxido de hidrógeno al 33% p/v y se colocaron en una estufa a 120° C durante 60 minutos para completar la digestión. A continuación, se añadieron 2 ml de agua ultrapura Mili-Q y, una vez enfriadas, las muestras digeridas se diluyeron hasta un volumen final de 10 ml con agua Mili-Q. Las muestras de hígado, riñón, bazo, cerebro y músculo (2 g aproximadamente) se sometieron a una digestión ácida con 5 ml de ácido nítrico al 69% y 2 ml de peróxido de hidrógeno al 33% p/v en un sistema de digestión por microondas (Milestone, Ethos Plus). Una vez digeridas las muestras se transfirieron a tubos de polipropileno y se diluyeron a 25 ml con agua Mili-Q. Las concentraciones de elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se y Zn) se midieron por Espectroscopía de Masas con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-MS, VGELEMENTAL PlasmaQuad SOption).

Se llevó a cabo un programa de control de calidad analítica durante todo el estudio. Se analizaron blancos junto con las muestras y los valores fueron restados de las lecturas de las muestras antes de calcular los resultados. Los límites de detección en la digestión ácida se calcularon como tres veces la desviación estándar de los blancos y el límite de cuantificación se calculó teniendo en cuenta el peso medio de la muestra y del volumen analizado. Las recuperaciones analíticas se determinaron partir de dos materiales de referencia (CRM 1598a Bovine Serum, material de referencia estándar suero bovino y 1577c Bovine Liver, material de referencia estándar hígado bovino) analizado junto a las muestras. Los resultados se dan en la **Tabla 3** y las recuperaciones tuvieron buenos resultados.

Tabla 3. Límites de detección (LD) ($\mu\text{g/L}$) y resultados del análisis de los materiales de referencia certificados: bovine liver SRM-1577 (mg/kg) y bovine serum SRM-1598 ($\mu\text{g/L}$)

Elemento	LD ($\mu\text{g/L}$)	Material de Referencia Certificado			
		SRM 1577(media \pm DE; mg/kg)		SRM 1598 (media \pm DE; $\mu\text{g/L}$)	
		Valores certificados	Valores analizados	Valores certificados*	Valores analizados
Co	0.2	0.300 \pm 0.018	0.311 \pm 0.011	1.24 \pm 0.07	1.09 \pm 0.08
Cr	0.1	0.053 \pm 0.014	0.051 \pm 0.011	(0.33 \pm 0.08)	0.34 \pm 0.07
Cu	2.3	275.2 \pm 4.6	272.9 \pm 12.2	1580 \pm 90	1524 \pm 70
Fe	6.1	197.94 \pm 0.65	196.07 \pm 2.69	1680 \pm 60	1696 \pm 80
Mn	1.1	10.46 \pm 0.47	10.49 \pm 0.23	1.78 \pm 0.33	1.80 \pm 0.27
Mo	1.4	3.30 \pm 0.13	3.32 \pm 0.13	(5.5 \pm 1.0)	5.4 \pm 0.9
Ni	0.4	0.0445 \pm 0.0092	0.0498 \pm 0.0104	0.94 \pm 0.18	0.98 \pm 0.13
Se	2.1	2.031 \pm 0.045	1.999 \pm 0.031	134.4 \pm 5.8	132.2 \pm 3.8
Zn	8.9	181.1 \pm 1.0	181.4 \pm 0.9	880 \pm 24	833 \pm 36

* En paréntesis valores de referencia o informativos (no certificados)

2.4. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS para Windows (vs 20.0). Se utilizó la prueba de Kolgomorov-Smirnov para determinar si los datos seguían una distribución normal. Para evaluar el efecto de la raza (HF, RG y RG x HF) sobre los rendimientos y las concentraciones de elementos traza en sangre y en los tejidos se utilizaron ANOVA de una vía y pruebas post-hoc de Tukey. La influencia del rendimiento de la canal y el peso del hígado en las concentraciones de elementos traza se evaluó mediante un análisis de correlación (coeficiente de Pearson). Las diferencias en los resultados se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos productivos de los animales de estudio se muestran en la **Tabla 2**. La ingesta diaria y la conversión fueron significativamente mayores en terneros HF (8.77 kg/d y 5.41, respectivamente) que en RG (7.45 y 4.84), mientras que los terneros cruzados RGxHF mantuvieron niveles intermedios (8.06 y 5.1). Cuando se valoraron los parámetros de rendimiento al sacrificio, el peso de la canal (202 ± 21 kg) y el rendimiento de la canal ($50.4 \pm 1.21\%$) fueron significativamente menores en los terneros HF que en los terneros RG (244 ± 22 y 60.7 ± 2.88 , respectivamente), con los cruces (RGxHF) de nuevo con valores intermedios (231 ± 22 y 57.9 ± 2.31). Las vísceras fueron significativamente más pesadas en terneros HF que los de raza RG y RGxHF (Fiems, 2012).

Las concentraciones de los elementos traza en suero de los terneros de nuestro estudio se muestran en la **Tabla 4**. Las concentraciones séricas de elementos traza estaban dentro de los niveles considerados adecuados por Puls (1994), Suttle (2010) y Herdt y Hoff (2011). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de los elementos entre las diferentes razas, excepto en el manganeso, cuyas concentraciones fueron significativamente más altas en los terneros HF (10.98 ± 0.86 µg/l) que en los terneros RG (7.44 ± 0.72 µg/l), nuevamente con valores intermedios para los cruces. Las concentraciones de zinc tendieron ($p = 0.09$) a ser más altas en terneros HF (1.34 ± 0.05 mg/l) que en las otras razas (1.24 ± 0.05 y 1.20 ± 0.03 mg/l para RG y RGxHF, respectivamente).

Tabla 4. Concentración de elementos traza en suero de terneros de raza Frisona (HF), Rubia Gallega (RG) y sus cruces (RG x HF)

	HF		RG x HF		RG		p	Rango normal (Puls, 1994)
	media±SE	rango	media±SE	rango	media±SE	rango		
Co (µg/l)	1.40 ± 0.01	(1.35-1.44)	1.39 ± 0.01	(1.35-1.45)	1.38 ± 0.01	(1.30-1.45)		0.9-15
Cr (µg/l)	0.274 ± 0.064	(0.239-0.300)	0.298 ± 0.011	(0.249-0.353)	0.289 ± 0.016	(0.187-0.369)		0.25-0.30
Cu (mg/l)	0.786 ± 0.021	(0.703-0.873)	0.773 ± 0.029	(0.616-0.912)	0.812 ± 0.020	(0.713-0.908)		0.6-1.5
Fe (mg/l)	2.11 ± 0.03	(1.93-2.27)	2.10 ± 0.03	(1.98-2.25)	2.18 ± 0.07	(1.93-2.59)		1.3-2.5
Mn (µg/l)	10.98 ± 0.86^a	(8.75-17.83)	9.29 ± 0.42^{ab}	(6.30-11.37)	7.44 ± 0.72^b	(6.55-10.84)	**	6-70
Mo (µg/l)	50.4 ± 3.4	(37.1-73.2)	54.5 ± 3.3	(44.3-73.2)	54.3 ± 2.72	(36.1-69.4)		10-100
Ni (µg/l)	3.21 ± 0.09	(2.94-3.44)	3.19 ± 0.07	(2.97-3.33)	3.22 ± 0.02	(3.01-3.32)		1.2-5.6
Se (mg/l)	0.253 ± 0.029	(0.130-0.425)	0.256 ± 0.029	(0.145-0.456)	0.268 ± 0.022	(0.181-0.408)		0.08-0.3
Zn (mg/l)	1.34 ± 0.05	(0.93-1.48)	1.24 ± 0.05	(1.05-1.51)	1.20 ± 0.03	(0.98-1.32)		0.80-1.40

Diferentes letras indican diferencias significativas entre razas ($p < 0.05$). ** $p < 0.01$

La **Figura 1** muestra las concentraciones de oligoelementos en las vísceras de los terneros del estudio. Las concentraciones de elementos traza en el hígado (el principal órgano para el metabolismo de oligoelementos y, en consecuencia, el mejor indicador del estatus de oligoelementos) fueron adecuadas (Puls, 1994). La única excepción fue el cobre: las concentraciones de cobre hepático en todos los terneros fueron superiores a los niveles permitidos (25-100 mg/kg de peso fresco: Puls, 1994). Por otra parte, 90, 70 y 40% de las muestras de hígado de terneros de HF, cruce RGxHF y RG respectivamente, superaron el nivel máximo recomendado de cobre en hígado destinado al consumo humano (140 mg/kg de peso fresco), propuesto por la EFSA (EFSA, 2012). Al igual que en estudios anteriores llevados a cabo en la misma zona de estudio (Miranda et al., 2006, 2010), las concentraciones hepáticas de cobre fueron significativamente más altas en terneros HF (189 ± 38 mg/kg de peso fresco) que en RG (138 ± 28 mg/kg) y las concentraciones fueron intermedias en los terneros cruce RGxHF (167 ± 48 mg/kg). No se observaron diferencias estadísticamente significativas para otros oligoelementos en el hígado, aunque las concentraciones hepáticas tendieron a ser más bajas en los terneros HF.

La principal diferencia relacionada con la raza se observó en las concentraciones de elementos traza en el músculo (**Figura 1**): las concentraciones de cobre, hierro, manganeso, selenio y zinc fueron significativamente mayores en terneros HF que en los terneros RG, manteniendo los terneros de cruce (RGxHF) una posición intermedia.

Este patrón de distribución de elementos traza, es decir, que no existen diferencias raciales en el suero ni en la mayoría de los órganos (incluyendo el hígado), pero con mayor concentración de oligoelementos en el músculo de los terneros HF, puede estar asociado con una menor masa muscular en los terneros de raza de aptitud láctea (HF y cruces RGxHF), como se describió anteriormente para el cobre (Miranda et al., 2010). De hecho, cuando se evaluaron las correlaciones entre las concentraciones de elementos traza y el rendimiento de la canal (como un indicador general de la masa muscular), se observó una correlación negativa para todos estos elementos (**Figura 2**). Curiosamente, aunque las concentraciones de elementos traza en el músculo fueron más bajas que en otros tejidos (1-2 unidades de magnitud menor que en el reservorio principal, **Figura 1**), las concentraciones totales de oligoelementos fueron más altas en este tejido que en el resto de los órganos debido al gran volumen de músculo. Las relaciones negativas entre el rendimiento de la canal y las concentraciones de elementos traza en el músculo pueden sugerir una mayor necesidad de movilización de minerales en el músculo en razas de carne (Miranda et al., 2010). Las concentraciones de elementos traza en el músculo no sólo dependen de la ingesta en la dieta sino también de la capacidad metabólica del animal para enviar oligoelementos desde el hígado hacia el músculo. Es posible que los terneros HF tengan una mayor capacidad metabólica para enviar oligoelementos al músculo. De hecho, se sabe que las razas de leche tienen una mayor capacidad metabólica en hígado que las razas de vacuno de carne (Baldwin et al., 2004, Bellmann et al., 2004), que está relacionada con el mayor tamaño del hígado en las razas de leche (Taylor y Murray, 1991). El peso del hígado varió significativamente en los terneros del estudio (6.12 ± 0.98 ; 5.24 ± 0.42 ; 4.67 ± 0.48 , en HF, RGxHF y RG, respectivamente) y se asoció positivamente con las concentraciones de elementos traza en el músculo (**Figura 3**).

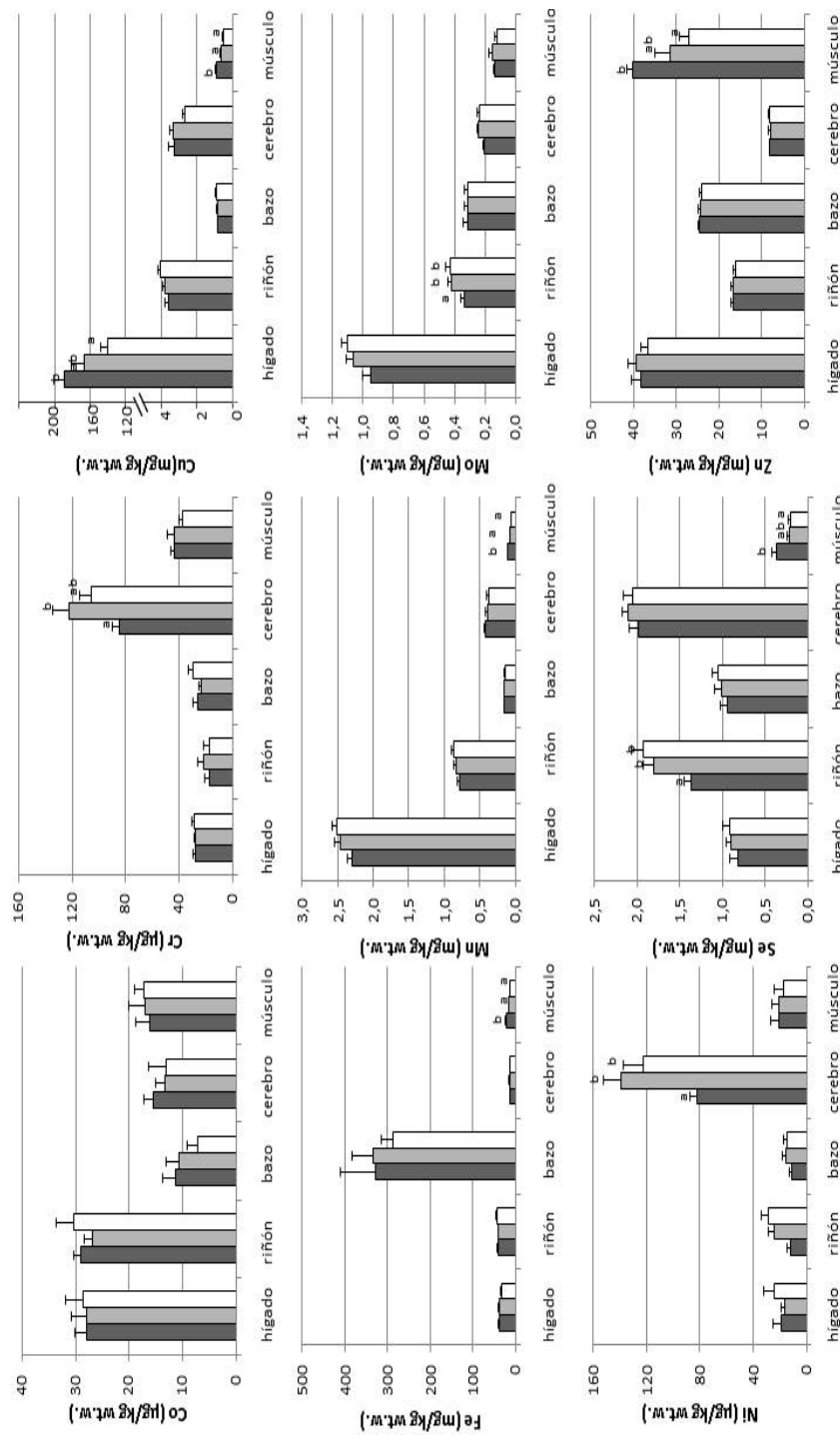


Figura 1. Niveles de elementos traza en peso fresco (wt.w.) en hígado, riñón, bazo, cerebro y músculo en terneros de raza Frisona (HF) (■), Rubia Gallega (RG) (□) y sus cruces (RGxHF) (▨). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($p < 0.05$).

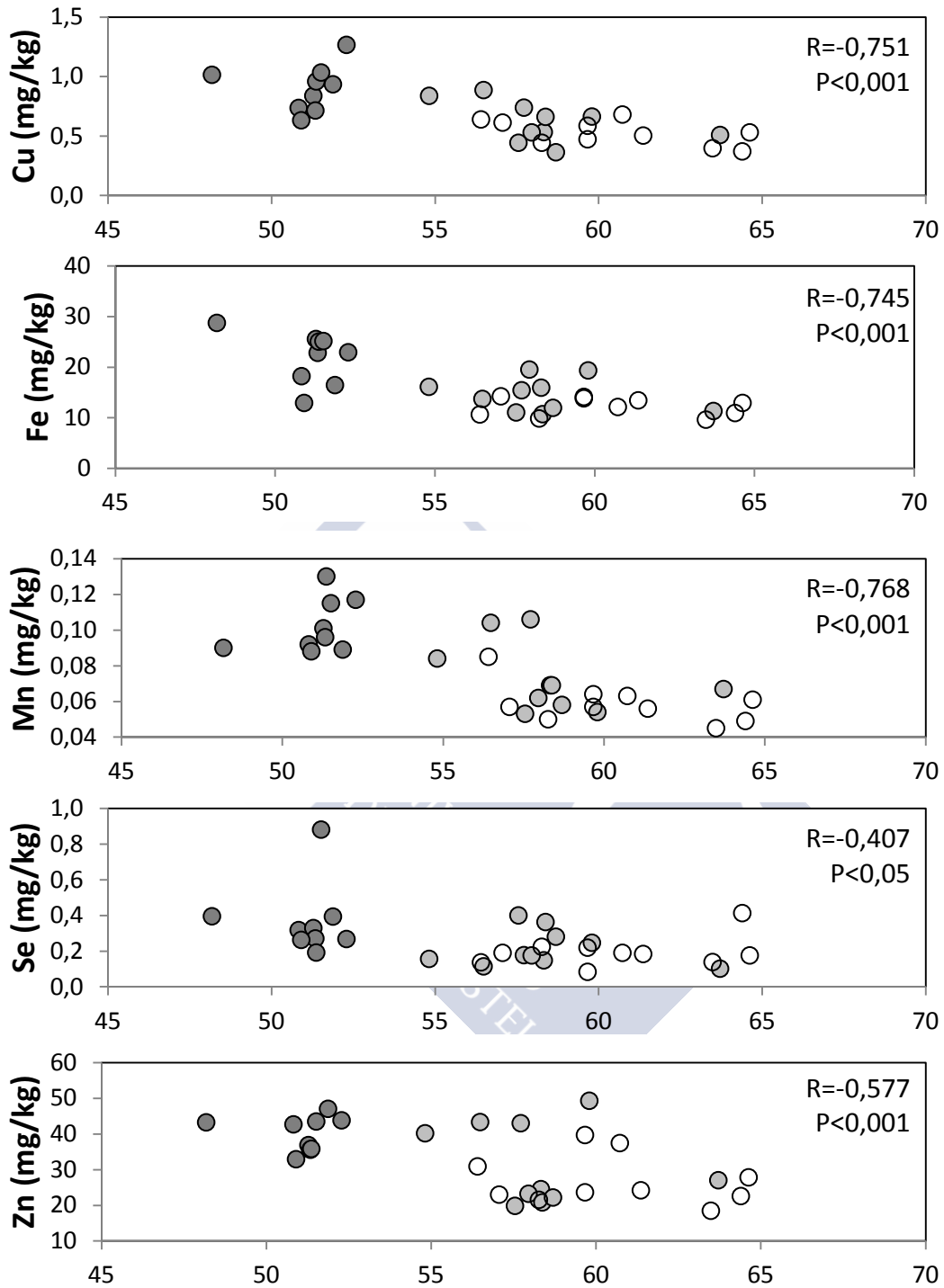


Figura 2. Gráfico mostrando la correlación entre rendimiento de la canal (%) y los niveles de elementos traza en el músculo en terneros de raza Frisona (HF) (●), Rubia Gallega (RG) (○) y sus cruces (RGxHF) (◐).

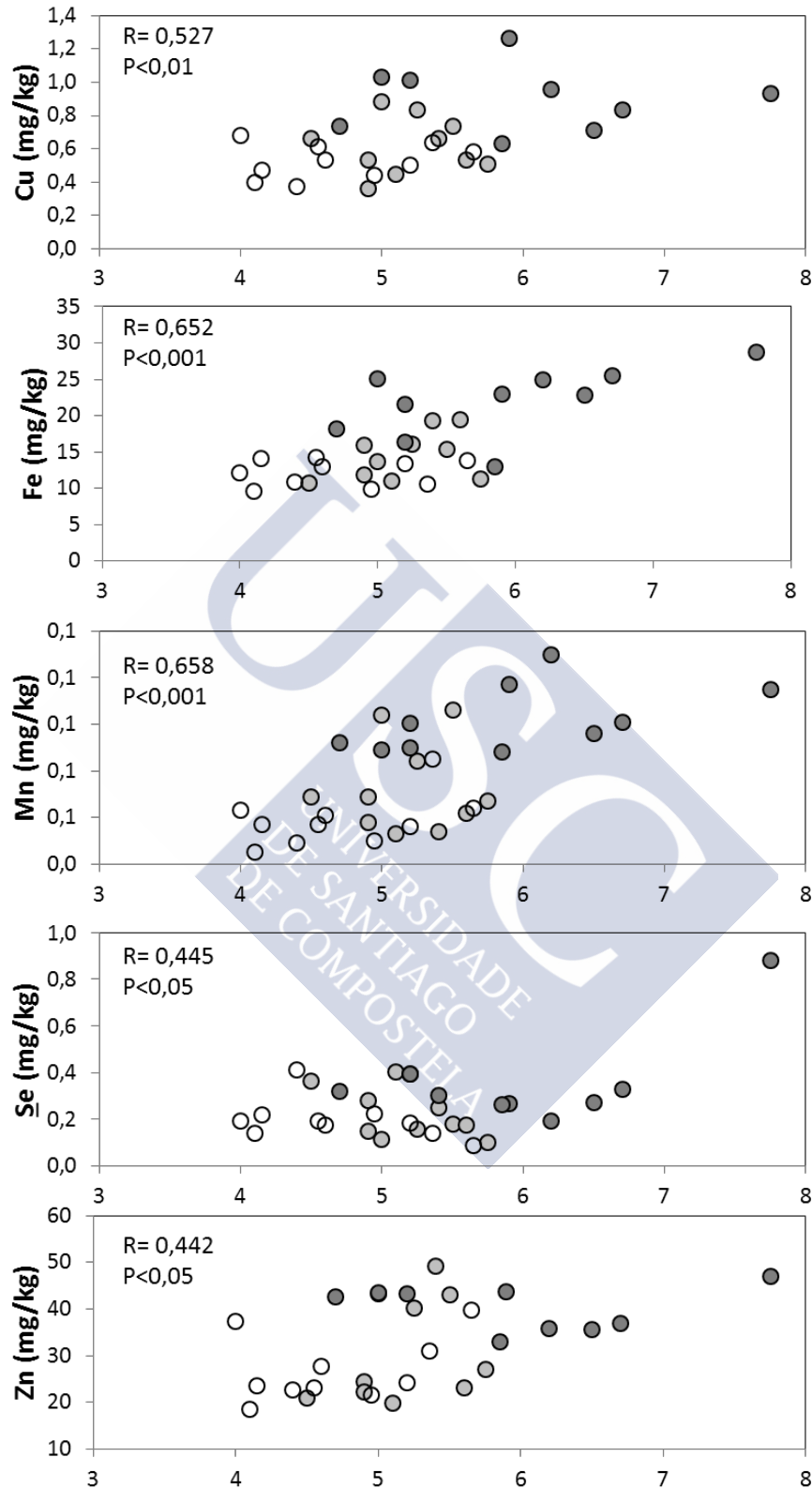


Figura 3. Gráfico mostrando la correlación entre el peso del hígado (Kg peso fresco) y los niveles de elementos traza en el músculo en terneros de raza Frisona (HF) (●), Rubia Gallega (RG) (○) y sus cruces (RGxHF) (◐).

Las diferencias metabólicas relacionadas con la raza también pueden explicar las diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de selenio y molibdeno en riñón: las concentraciones de ambos elementos fueron menores en terneros HF que en RG, con concentraciones intermedias observadas una vez más en los cruce (RGxHF). El selenio y el molibdeno, junto con el yodo, se excretan por vía renal (Suttle, 2010): son absorbidos en exceso en el intestino (proporcionalmente a su concentración en la dieta) y su regulación homeostática ocurre principalmente en el riñón. Este tipo particular de metabolismo hace factible aumentar las concentraciones tisulares de los elementos y se ha aprovechado en la industria para producir productos animales (leche, carne) enriquecidos con yodo y selenio (Schöne et al., 2009; Stockdale et al., 2011). Sin embargo, aunque las diferencias relacionadas con la raza en la excreción biliar están bien descritas en el vacuno para elementos como el cobre y el zinc (Gooneratne et al., 1994, 2013), hasta donde sabemos no hay información disponible en relación con las diferencias relacionadas con la raza en la excreción renal de los elementos traza.

Las concentraciones de cromo y níquel en el tejido cerebral difirieron significativamente en los terneros del estudio. Para ambos elementos, las concentraciones medias más bajas se encontraron en terneros HF y las más altas en los terneros de cruce (RGxHF) (**Figura 1**). La información sobre el metabolismo del cromo y el níquel en vacuno es escasa. Ambos elementos se asocian comúnmente en la naturaleza (Miranda et al., 2009) y se usan en muchos procesos industriales y antropogénicos (es decir, para fabricar aleaciones dentales). Aunque el cromo y el níquel se han considerado durante mucho tiempo como elementos no esenciales tóxicos, los datos recientes indican que ambos son generalmente necesarios en pequeñas cantidades para el crecimiento normal de los animales y por lo tanto ahora se consideran micronutrientes esenciales (Samal and Mishra, 2011; Sahin et al., 2013). El papel del cromo en el metabolismo de la glucosa, como parte del factor de tolerancia a la glucosa es especialmente importante (potenciando la acción de la insulina y mejorando la utilización de la glucosa, Vincent, 2000), concretamente en el cerebro, en el cual el cromo alivia el estrés oxidativo cerebral que provoca la hiperglucemia en la diabetes (Sahin et al., 2012). Aunque es difícil discutir la relevancia de nuestros hallazgos en vista de la falta de información sobre el metabolismo de estos elementos, es posible que las diferencias relacionadas con la raza en las concentraciones de cromo y níquel en el cerebro puedan estar al menos en parte relacionadas con diferencias en el metabolismo de la glucosa dependiendo del predominio de un metabolismo anabólico en las razas de carne (RG) o catabólico en las de leche (HF).

4. CONCLUSIÓN

Los resultados indican que la suplementación estándar de oligoelementos empleada en los sistemas de cría intensiva de terneros de cebo es la adecuada para la mayoría de razas criadas en el Norte de España, a pesar de que la suplementación con cobre puede ser excesiva haciendo que se acumulen altas cantidades de cobre en el hígado, sobre todo en terneros frisonos. La menor masa muscular de los terneros frisonos y su mayor capacidad metabólica para transportar estos elementos del hígado al músculo podrían explicar la mayor concentración de oligoelementos que aparece a nivel muscular en los

frisonas. Dado que la carne es una fuente esencial de oligoelementos muy utilizada en la dieta humana, se necesitan nuevos estudios para esclarecer las diferencias raciales en las concentraciones de oligoelementos a nivel muscular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (España) (PGIDIT04RAG261005PR y 07MRU030261PR). Los autores dan las gracias a Lucía Casanova Iglesias y al personal de la RIAIDT de la USC por el apoyo técnico.

REFERENCIAS

Baldwin RL, McLeod KR, Capuco AV. 2004. Visceral tissue growth and proliferation during the bovine lactation cycle. *Journal of Dairy Science*. 87: 2977-2986.

Bellmann O, Wegner J, Teuscher F, Schneider F, Voigt J, Derno M, Sauerwein H, Weingärtner J, Ender K. 2004. Beef versus dairy cattle: a comparison of metabolically relevant hormones, enzymes and metabolites. *Livestock Production Science*. 85: 41-54.

Commission Regulation. 2003. (EC) No 1334/2003/EC on amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. *Official Journal of the European Union*. L187: 11-15.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2012. Scientific Opinion on the safety and efficacy of copper compounds (E4) as feed additives for all animal species: cupric sulphate pentahydrate based on a dossier submitted by Manica S.P.A. *EFSA Journal*. 10(12): 2969. [38 pp.].

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2014. Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. *EFSA Journal*. 12(5): 3668-3677.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2016. Revision of the currently authorised maximum copper content in complete feed. *EFSA Journal*. 14(8): 4563 [100 pp.].

Fiems LO. 2012. Double Muscling in Cattle: Genes, Husbandry, Carcasses and Meat. *Animals*. 2 (3): 472.

Gooneratne SR, Symonds HW, Bailey JV, Christensen DA. 1994. Effects of dietary copper, molybdenum and sulphur on biliary copper and zinc excretion in Simmental and Angus cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. 74: 315-325.

Gooneratne SR, Laarveld B, Pathirana KK, Christensen DA. 2013. Biliary and plasma copper and zinc in pregnant Simmental and Angus cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 80(1): 577 [7 pp.].

Herdt TH, Hoff B. 2011. The use of blood analysis to evaluate trace mineral status in ruminant livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 27: 255-283.

López-Alonso M, Miranda M. 2012. Implications of excessive livestock mineral supplementation on environmental pollution and human health. In: *Trace Elements: Environmental Sources, Geochemistry and Human Health*. (Ed. DA De Leon, PR Aragon). pp: 40-53. Nova Science publishers.

Miranda M, Cruz JM, López-Alonso M, Benedito JL. 2006. Variations in liver and blood copper concentrations in young beef cattle raised in north-west Spain: associations with breed, sex, age and season. *Animal Science*. 82(2): 253-258.

Miranda M, Benedito JL, Blanco-Penedo I, López-Lamas C, Merino A, López-Alonso M. 2009. Metal accumulation in cattle raised in a serpentine-soil area: relationship between metal concentrations in soil, forage and animal tissues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 23(3): 231-238.

Miranda M, Gutiérrez B, Benedito JL, Blanco-Penedo I, García-Vaquero M, López-Alonso M. 2010. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Archives of Animal Nutrition*. 64(2): 98-110.

NRC (National Research Council). 2016. Nutrient requirements of beef cattle, eighth revised edn. National Academy Press, Washington, DC.

Petersen MK. 1999. Considerations in trace mineral supplementation. Beef cattle handbook, BCH-5455. Product of Extension Beef Cattle Resource Committee, [http://www1.foragebeef.ca/\\$foragebeef/frgebeef.nsf/all/ccf1019/\\$FILE/tracemineralconsiderations.pdf](http://www1.foragebeef.ca/$foragebeef/frgebeef.nsf/all/ccf1019/$FILE/tracemineralconsiderations.pdf).

Pogge DJ, Richter EL, Drewnoski ME, Hansen SL. 2012. Mineral concentrations of plasma and liver after injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle. *Journal of Animal Science*. 90: 2692-2698.

Puls R. 1994. Mineral Levels in Animal Health. Diagnostic Data. 2nd edn. Sherpa International, Clearbook, BC.

Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Ali S, Sahin N, Gencoglu H, Ozdan Y. 2013. Chromium modulates expressions of neuronal plasticity markers and glial fibrillary acidic proteins in hypoglycemia-induced brain injury. *Life Sciences*. 93: 1039-1048.

Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Gencoglu H, Ulas M, Atalay M, Sahin N, Hayirli A, Komorowski JR. 2012. The effects of chromium picolinate and chromium histidinate administration on NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathway in the brain of diabetic rats. *Biological Trace Element Research*. 50: 291-296.

Samal L, Mishra C. 2011. Significance of nickel in livestock health and production. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*. 5(3): 349-361.

Schöne F, Leiterer M, Lebzien P, Bemmam D, Spolders M, Flachowsky G. 2009. Iodine concentration of milk in a dose-response study with dairy cows and implications for consumer iodine intake. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 23(2): 84-92.

Stockdale CR, Shields PM, McKenna A, Walker GP, Dunshea FR, Doyle PT. 2011. Selenium levels in cows fed pasture and concentrates or a total mixed ration and supplemented with selenized yeast to produce milk with supra nutritional selenium concentrations. *Journal of Dairy Science*. 94: 262-272.

Suttle NF, Lewis RM, Small NW. 2002. Effects of breed and family on rate of copper accretion in the liver of purebred Charollais, Suffolk and Texel lambs. *Animal Science*. 75: 295-302.

Suttle NF. 2010. Mineral nutrition of livestock. 4th edn. Cabi Publishing, Wallingford.

Taylor StCS, Murray JI. 1991. Effect of feeding level, breed and milking potential on body tissues and organs of mature, non-lactating cows. *Animal Production*. 53: 27-38.

Vincent JB. 2000. Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes. *Nutrition Reviews*. 58: 67-72.





3.2

Influencia de la aptitud racial (leche o carne) sobre la concentración de elementos traza en músculo

Adaptado de:

Miranda M, Pereira V, Carbajales P and López-Alonso. 2017. How important is beef or milk breed-aptitude on determining trace element concentration in muscles. *Food and Chemical Toxicology*.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar las concentraciones de elementos traza en varios músculos con diferente perfil oxidativo o glicolítico: diafragma (DI) y cardíaco (CA) (típico oxidativo), trapecio (TR) (intermedio oxidativo-glicolítico) y semimembranoso (SM) (típico glicolítico) en una raza de aptitud láctea (Frisona: HF); una raza de aptitud cárnica (Rubia Gallega: RG) y el cruce de ambas razas (RGxHF). Se sacrificaron 10 terneros de cada raza en matadero y se obtuvieron muestras de los distintos músculos. Las concentraciones de elementos traza se determinaron por ICP-MS. Nuestros resultados indican que el tipo de músculo fue un factor muy significativo en el análisis de todos los elementos, mientras que la raza sólo fue significativa para Fe, Mn y Zn. Sólo se encontraron diferencias raciales significativas en SM: donde los terneros de raza RG y los cruces (RGxHF) mostraron una concentración significativamente menor de los principales oligoelementos (Cu, Fe, Se y Zn) que los HF. La concentración de estos oligoelementos en el músculo SM se asoció negativamente con el rendimiento de la canal. Aparte de este comportamiento particular para SM, el patrón de distribución de estos elementos en los otros músculos fue similar en los tres grupos raciales con concentraciones de oligoelementos significativamente más altas en CA, seguido por DI, mientras que en el SM y TR las concentraciones de los elementos traza fueron muy similares. Para los otros elementos que estaban a concentraciones muy bajas en el músculo (Co, Cr, Mo y Ni) no se observó ningún patrón asociado. Nuestros resultados indican que las diferencias interraciales observadas en las concentraciones de elementos traza en el músculo en nuestro estudio (SM) se relacionan principalmente con diferencias en su perfil oxidativo-glicolítico, probablemente relacionado con el grado de hipertrofia de algunos músculos en razas muy musculadas.

Palabras clave: elementos traza, músculo, raza, carne, leche

1. INTRODUCCIÓN

Las carnes rojas magras desempeñan un papel importante en las dietas saludables y equilibradas debido a su alta cantidad de nutrientes. Además de ser un alimento rico en proteína y bajo en carbohidratos, la carne roja contiene oligoelementos esenciales en concentraciones más altas y más absorbibles que otros alimentos. Especialmente importante es el papel del hierro (Fe) para prevenir la anemia; zinc (Zn) para el sistema inmunitario y la fertilidad, y las propiedades antioxidantes del selenio (Se) para reducir el riesgo de enfermedades cardíacas y ciertos tipos de cáncer (Biesalski, 2005; Cabrera et al., 2010; Cabrera y Saadoun, 2014; Mateescu et al., 2014).

Las concentraciones de elementos traza no están uniformemente distribuidas a lo largo de la canal. Aunque tradicionalmente era bien sabido que las concentraciones de Fe eran más altas en los músculos rojos, estudios recientes (Czerwonka and Szterk 2015; López-Alonso et al., 2016; McGilchrist et al., 2016) también indican que la mayoría de los oligoelementos varían significativamente a lo largo de la canal: los cortes de ternera que incluyen músculos con una alta proporción de fibras oxidativas de contracción lenta (músculos rojos) mostraron concentraciones de oligoelementos más

altas que los cortes de ternera que incluyen músculos con fibras glicolíticas de contracción rápida (músculos blancos).

Además, las diferencias interraciales en las concentraciones de oligoelementos en la carne están bien documentadas en la literatura (Cabrera et al., 2010, Ramos et al., 2012, Pilarczyk, 2014, Duan et al., 2015, Domaradzki et al., 2016). Estudios recientes señalan que las concentraciones de minerales traza en el músculo están, al menos en parte, determinadas genéticamente (Morris et al.; 2013; Mateescu et al., 2014; Mortiner et al., 2014) y que los genes implicados pueden actuar a través de proteínas receptoras, transportadoras y chaperones (Morris et al., 2013) y, curiosamente, las concentraciones de elementos traza están relacionadas con las principales propiedades organolépticas (Duan et al., 2015).

Los resultados de un estudio reciente en terneros de cebo indican que se encontraron concentraciones de elementos traza significativamente mayores en el músculo de una raza de terneros de aptitud láctea (Frisona) en comparación con terneros de raza de carne (Rubia Gallega), mostrando el cruce entre ambas razas una posición intermedia (Pereira et al., 2017). Basándose en la evaluación de las concentraciones de elementos traza en sangre y otros órganos internos, la explicación más plausible parece ser la capacidad de las diferentes razas para enviar oligoelementos hacia los músculos. Esta capacidad podría estar relacionada con diferencias significativas en la masa muscular (mayor en las razas de aptitud cárnica) y en la actividad metabólica (mayor en las razas de aptitud láctea). Sin embargo, también es posible que las diferencias entre razas, en las concentraciones de elementos traza en la carne, pudieran estar relacionadas, al menos en parte, con diferencias en la composición muscular. La selección para un aumento de la musculatura en las especies animales de producción, ha mostrado un aumento de la proporción de las miofibras glicolíticas de contracción rápida tipo IIX en bovinos (Wegner et al., 2000), ovejas (Greenwood et al., 2006) y cerdos (Karlsson et al., 1999; Ruusunen y Puolanne, 2004).

A día de hoy, pocos estudios han evaluado la concentración de elementos traza en los diferentes tipos de músculos (dependiendo de su capacidad oxidativa o glicolítica) y en las diferentes razas de producción. Estos estudios permitirían conocer en detalle en qué grado estas diferencias raciales pueden afectar a la composición muscular y al metabolismo de los elementos traza desencadenando diferencias en las concentraciones de elementos traza a lo largo de la canal. El objetivo de este estudio es evaluar las concentraciones de los elementos traza en varios músculos con diferente perfil oxidativo/glicolítico (diafragma (DI): típico oxidativo, trapecio (TR): oxidativo/glicolítico intermedio y semimembranoso (SM): típico glicolítico) en una raza de aptitud láctea (Frisona: HF); una raza de aptitud cárnica (Rubia Gallega: RG) y sus cruces (RGxHF). Debido a la alta concentración de elementos traza y a su estructura particular (fibras lentas α -cardíacas) el músculo cardíaco (CA) también se incluyó en el estudio.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales de estudio

Se seleccionaron 30 animales para el estudio: 10 de aptitud láctea (Frisona: HF); 10 de aptitud cárnica (Rubia gallega: RG), la principal raza de aptitud de carne en la región del estudio con alta presencia en el mercado nacional, y 10 cruces de ambas razas (RGxHF). Los terneros fueron alimentados con una dieta estándar (incluyendo el suplemento de elementos traza) basada en pienso. Se recogieron las muestras de los músculos en el matadero. Los animales se seleccionaron aleatoriamente de un lote mayor (n=214) que se había criado en un cebadero en las condiciones típicas de alimentación de España. Los detalles de los ingredientes y la composición nutricional de la dieta se muestran en la **Tabla 1**. A los animales se les permitió libre acceso al pienso, al agua y a la paja de cebada.

Tabla 1. Ingredientes y composición química de las dietas aportadas en el estudio.

Ingredientes (% MS: materia seca)	
Maíz	29
Cebada	19.5
Harina soja (44% PB)	13.9
Gluten feed de maíz	12.4
Salvado de trigo	8.4
Cascarilla de soja	7.5
Melazas	3.5
Aceite de palma	2
Vitaminas/mineral premix*	3.2
Bicarbonato de sodio	0.6
Composición química (% MS: materia seca)	
Proteína bruta (PB)	15.5
Fibra bruta (FB)	5.6
Fibra neutro detergente (FND)	21.6
Fibra ácido detergente (FAD)	7.2
Extracto éter (EE)	4.7
Cenizas	5.1

* Vitaminas y mineral premix contiene (por kg MS premix): 10.000 IU vitamina A, 2000 IU vitamina D, 10 mg vitamina E, 0.3 mg Co, 16 mg Cu, 10 mg Fe, 1.8 mg I, 110 mg Mn, 0.3 mg Se and 120 mg of Zn

2.2. Recogida de muestras

Cuatro tipos de músculos fueron seleccionados en nuestro estudio: el músculo cardíaco (CA) y el diafragma (DI), por ser los músculos con mayor capacidad oxidativa basados en su actividad oxidativa-glicolítica, el trapecio (TR) como ejemplo de músculo

con alto predominio de fibras de contracción rápida (intermedio oxidativo-glicolítico) y el semimembranoso (SM) como indicativo de músculo con un alto predominio de fibras de contracción lenta (típico glicolítico) (Talmant et al., 1986).

Las muestras se recogieron inmediatamente después del sacrificio. Todas las muestras fueron refrigeradas inmediatamente y llevadas al laboratorio. Los trozos de músculo se limpiaron de tejido conectivo y grasa. Se hicieron submuestras por triplicado (aproximadamente 10 g) y se almacenaron a -20°C hasta el momento del análisis.

2.3. Datos zootécnicos

Se registraron los pesos de las canales, de los hígados y el rendimiento de las canales. Los pesos de las canales (kg) fueron de 204 ± 23 , 244 ± 21 y 231 ± 28 para HF, RG y RGxHF, respectivamente. Los pesos de los hígado fueron de 6.12 ± 0.92 , 4.68 ± 0.61 y 5.14 ± 0.54 para HF, RG y RGxHF, respectivamente. Los rendimientos de las canales (%) fueron de 52.2 ± 1.21 , 62.4 ± 3.11 y 59.7 ± 2.33 para HF, RG y RG x HF, respectivamente.

2.4. Análisis de las muestras

Las muestras de músculo (1 g aproximadamente) se sometieron a una digestión ácida en 5 ml de ácido nítrico al 69% y 3 ml de peróxido de hidrógeno al 33% p / v en un sistema de digestión con microondas (Ethos Plus, Milestone, Sorisole, Italia). Una vez digeridas las muestras se transfirieron a tubos de polipropileno y se diluyeron a 15 ml con agua mili-Q. Se determinaron las concentraciones de cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn) por Espectroscopía de Masas con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-MS, VGELEMENTAL PlasmaQuad SOption).

Se aplicó un control de calidad analítico a lo largo del estudio. Se analizaron blancos junto con las muestras y los valores fueron restados de las lecturas de las muestras antes de calcular los resultados. Los límites de detección (LoD) se calcularon como tres veces la desviación estándar de los blancos (**Tabla 2**). Los límites de cuantificación, expresados como la concentración en la muestra, se calcularon sobre la base del peso medio de la muestra. Las recuperaciones analíticas se determinaron a partir de un material de referencia certificado (1577c Bovine Liver, Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, EE.UU.) que se analizó junto con las muestras. Los resultados se dan en la **Tabla 2** y las recuperaciones analíticas tuvieron buenos resultados.

2.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS para Windows (v. 20.0). La distribución normal del conjunto de los datos se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó un modelo lineal general (MLG) para comprobar la influencia de la raza y del tipo de músculo sobre la concentración de elementos traza en

los músculos, con el rendimiento de la canal y la relación de peso hígado: peso canal como covariables. Se utilizaron pruebas post-hoc de Tukey para evaluar el efecto de la raza (HF, RG y RG x HF) sobre las concentraciones de elementos traza en los diferentes tipos de músculos (TR, SM, DI, CA). La influencia del rendimiento de la canal sobre las concentraciones de elementos traza en los diferentes tipos de músculos (TR, SM, DI, CA) se evaluó mediante un análisis de correlación (coeficiente de Pearson). Las diferencias en los resultados se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

Tabla 2. Límites de detección (LD) ($\mu\text{g/L}$) y resultados del análisis del material de referencia certificado: bovine liver SRM-1577 (mg/kg).

Elemento	LD ($\mu\text{g/L}$)	SRM 1577(media \pm DE; mg/kg)	
		Valores analizados	Valores certificados
Co	0.1	0.307 \pm 0.014	0.300 \pm 0.018
Cr	0.2	0.050 \pm 0.016	0.053 \pm 0.014
Cu	4.3	274.1 \pm 13.7	275.2 \pm 4.6
Fe	11	198.01 \pm 1.94	197.94 \pm 0.65
Mn	2.1	10.11 \pm 0.18	10.46 \pm 0.47
Mo	1.3	3.27 \pm 0.11	3.30 \pm 0.13
Ni	0.3	0.0477 \pm 0.0111	0.0445 \pm 0.0092
Se	1.6	2.051 \pm 0.029	2.031 \pm 0.045
Zn	11	180.1 \pm 0.7	181.1 \pm 1.0

3. RESULTADOS

Los resultados del MLG para evaluar el efecto de la raza (HF, RG, RGxHF) y el tipo de músculo (TR, SM, DI, CA) en las concentraciones de elementos traza en los músculos en nuestro estudio se presentan en la **Tabla 3**. La inclusión del rendimiento de la canal y la relación de peso hígado: peso canal en el análisis (como covariables) no demostró ninguna influencia estadísticamente significativa sobre las concentraciones de elementos traza en los músculos y no mejoró el ajuste de los modelos (en todos los casos R^2 fueron bajas). Por consiguiente, ni el rendimiento de la canal ni la proporción entre el peso del hígado: peso canal fueron incluidos en el análisis. Las únicas excepciones fueron Cu y Mo: el rendimiento de la canal afectó significativamente a las concentraciones de Cu ($P=0.018$) y Mo ($P=0.005$), siendo la raza también significativa para Cu ($P=0.021$) y Mo ($P=0.007$).

En general, el tipo de músculo fue un factor muy significativo en el análisis ($p > 0.001$) para todos los elementos, mientras que la raza sólo fue significativa para Fe, Mn y Zn. Sin embargo, las interacciones significativas entre ambos factores, raza y tipo de músculo, para los principales oligoelementos (Cu, Fe, Se y Zn) indica un

comportamiento diferente de estos elementos en los diferentes grupos raciales dependiendo del tipo de músculo considerado.

El análisis detallado de las concentraciones de oligoelementos que mostraron interacciones significativas entre la raza y el tipo de músculo (**Figura 1**) muestra que la concentración de los principales oligoelementos (Cu, Fe, Se y Zn) fue muy similar en los tres grupos de raza ($p > 0.05$) excepto para SM, donde los terneros de raza RG y los cruces (RGxHF) mostraron concentraciones de oligoelementos significativamente más bajas que los terneros de raza HF. Aparte de este comportamiento particular para SM, el patrón de distribución de elementos traza en los otros tipos de músculos fue similar en los tres grupos de razas: se encontraron concentraciones significativamente más altas de oligoelementos ($p < 0.05$) en el músculo CA, seguido por el DI, mientras que las concentraciones de elementos traza en el SM y el TR fueron muy similares. Para Zn, por el contrario, las concentraciones más altas se encontraron en el TR, seguido por DI, SM y las más bajas en el CA.

A diferencia de los elementos antes mencionados, no se encontraron interacciones significativas entre la raza y el tipo de músculo para Mn. Así como en los otros oligoelementos, las mayores concentraciones de Mn fueron encontradas en la CA, seguida por la DI, y las más bajas en la SM y TR que no difirieron entre ellos. En todos los casos los terneros RG mostraron menores concentraciones de Mn en comparación con HF, los cruces muestran una posición intermedia, a pesar de que las diferencias fueron sólo estadísticamente significativa en SM y TR.

Para los otros elementos que se encontraban a muy bajas concentraciones en el músculo (Co, Cr, Mo y Ni), aunque se observaron diferencias estadísticamente significativas a través de los músculos analizados en nuestro estudio (**Tabla 3**) no se observó ningún patrón de distribución concreto.

Al evaluar las correlaciones entre los diferentes tipos de músculos y el rendimiento de la canal (**Tabla 4**) se encontraron correlaciones altamente significativas para la mayoría de los oligoelementos en el músculo SM.

Tabla 3. Resumen del análisis del modelo lineal general sobre las concentraciones de elementos traza en músculo, con la raza y tipo de músculo como factores principales. La significación estadística se indicó con ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

	breed	muscle	breed*muscle	R ²
Co	F _{2,119} = 0.811	F _{3,119} = 46.605 ***	F _{6,119} = 0.146	0.569
Cr	F _{2,119} = 0.507	F _{3,119} = 22.399 ***	F _{6,119} = 0.672	0.401
Cu	F _{2,119} = 0.761	F _{3,119} = 1773.665 ***	F _{6,119} = 3.617 **	0.979
Fe	F _{2,119} = 7.948 ***	F _{3,119} = 704.301 ***	F _{6,119} = 6.634 ***	0.953
Mn	F _{2,119} = 6.959 ***	F _{3,119} = 153.578 ***	F _{6,119} = 0.551	0.816
Mo	F _{2,119} = 1.115	F _{3,119} = 100.774 ***	F _{6,119} = 0.870	0.741
Ni	F _{2,119} = 1.070	F _{3,119} = 13.899 ***	F _{6,119} = 0.756	0.309
Se	F _{2,119} = 0.104	F _{3,119} = 33.947 ***	F _{6,119} = 3.830 **	0.487
Zn	F _{2,119} = 10.025 ***	F _{3,119} = 187.029 ***	F _{6,119} = 3.038 **	0.849

Tabla 4. Correlación de Pearson entre los niveles de elementos traza en los diferentes tipos de músculo (TR: trapecio; SM: semimembranoso; DI: diafragma; CA: cardíaco) y la conformación de la canal. La significación estadística de la correlación se indicó con $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

	TR	SM	DI	CA
Co	0.171	-0.002	0.273	0.022
Cr	-0.034	-0.064	-0.172	0.068
Cu	-0.376*	-0.753***	-0.263	0.012
Fe	-0.242	-0.745***	-0.057	0.004
Mn	-0.493**	-0.769***	-0.144	-0.227
Mo	0.096	0.122	0.016	-0.227
Ni	0.251	0.061	0.183	0.072
Se	-0.071	-0.423*	-0.045	0.190
Zn	-0.311	-0.579***	-0.096	-0.061

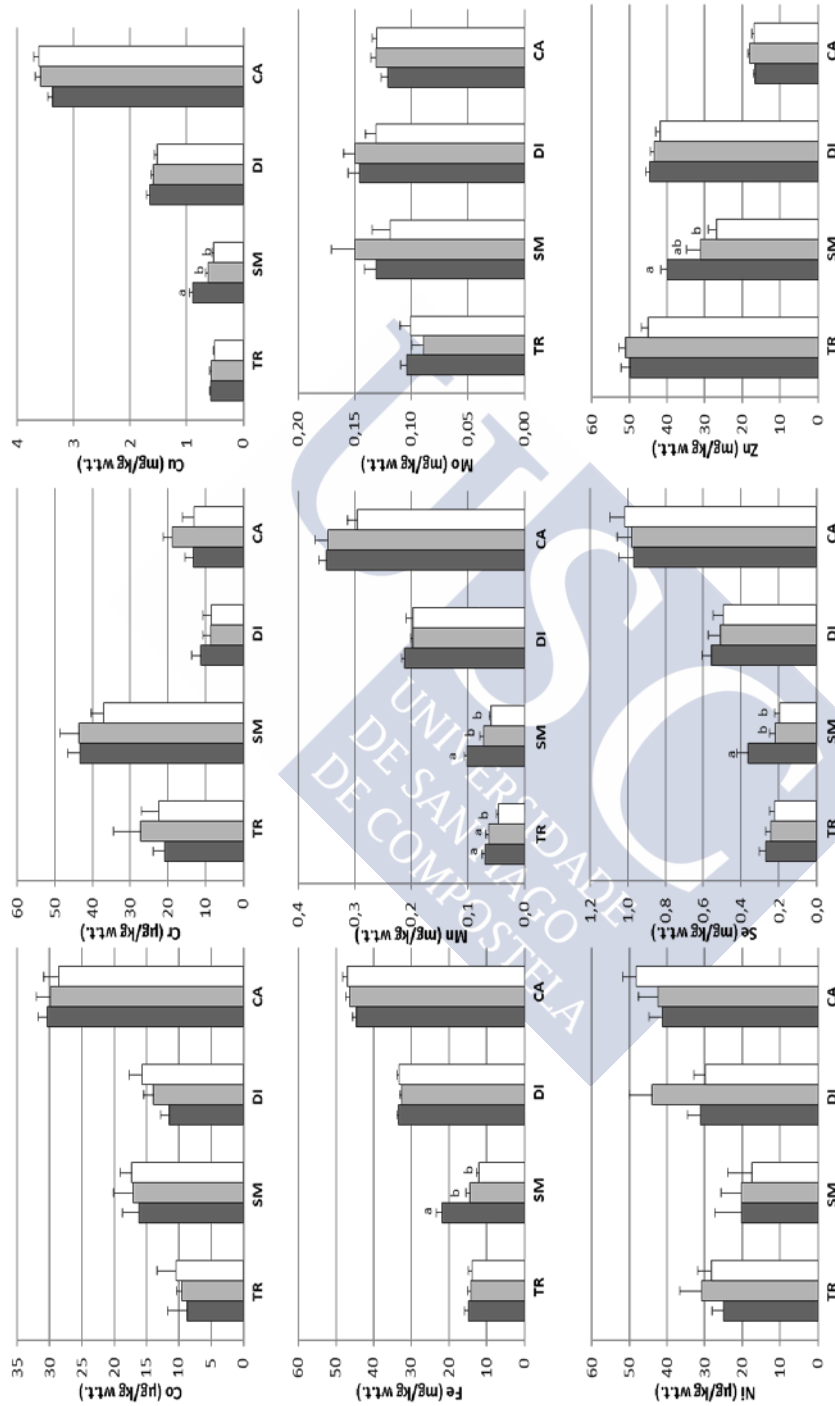


Figura 1. Concentraciones de elementos traza en peso fresco (wt.w.) en los diferentes músculos (TP: Trapecio, SM: Semimembranoso, DI: Diafragma, CA: Cardíaco) en Frisona (HF) (■), Rubia Gallega (RG) (□) y sus cruces (RGxHF) (▨). Diferentes letras dentro de un tipo de músculo indican diferencias estadísticamente significativas entre razas ($p < 0.05$).

4. DISCUSIÓN

Hay datos que demuestran que el metabolismo nutricional difiere mucho entre las razas de carne y las razas de leche (Baldwin et al., 2004; Bellmann et al., 2004; Da Costa et al., 2014). En nuestro estudio, los HF representa el perfil catabólico o de secreción típico de las razas lecheras, mientras que los RG representan el tipo anabólico o de acreción característico de las razas de carne (Pfuhl et al., 2007). En razas de leche, el tamaño proporcionalmente mayor de los órganos internos permite una mayor ingestión de alimento y una función hepática capaz de mantener una alta producción láctea. Desde un punto de vista endocrino, los pulsos más frecuentes con menor amplitud de la hormona del crecimiento, combinados con una menor concentración plasmática de insulina e IGF-1 (factor de crecimiento de la insulina tipo 1) en ganado de carne, dan como resultado un mayor aumento de peso absoluto y/o relativo del tejido muscular y menos tejido adiposo que en el ganado lechero (Bellmann et al., 2004).

Estas diferencias metabólicas, junto con las diferencias raciales observadas en la distribución de los elementos traza en sangre y órganos internos en terneros de cebo observadas previamente (capítulo 1 de esta tesis) (Pereira et al., 2017) nos llevaron a la hipótesis de que las menores concentraciones de oligoelementos (Cu, Fe, Se y Zn) en SM en RG y cruces (RGxHF) comparadas con HF (que representa el perfil de la raza de carne y las razas de leche, respectivamente) posiblemente estaban relacionados con una menor capacidad de las razas de carne para enviar oligoelementos del reservorio hepático hacia el músculo. Resultados similares se observaron cuando se estudió en profundidad la acumulación hepática de Cu en estas razas (Miranda et al., 2010). Sin embargo, los resultados del presente estudio muestran que aunque las concentraciones de los elementos traza en el músculo variaron significativamente dentro de los tres grupos de razas, sólo se encontraron diferencias significativas entre RG y HF en el músculo SM. Este hallazgo sugiere que las diferencias en las concentraciones de oligoelementos en el músculo SM probablemente no están relacionadas con una capacidad diferente para suministrar oligoelementos del hígado al músculo (excepto Cu y Mo), pero que podrían obedecer a otros factores relacionados con este músculo. El hecho de que las diferencias se encuentran en el músculo SM nos hace pensar que podría estar relacionado con el fenómeno de doble musculatura (DM) característico de la raza RG.

El fenómeno de DM se caracteriza por mutaciones que hacen que el gen de la miostatina sea inactivo, dando como resultado una hipertrofia muscular (Charlier et al., 1995, Grobet et al., 1997, McPherron et al., 1997, McPherron y Lee, 1997, Grobet et al., 1998). Los animales de doble musculatura se caracterizan por una conformación excelente y un rendimiento de la canal extremadamente alto, coincidiendo con una reducción del tamaño de los órganos (alrededor del 20%, Vissac, 1968; Ansay y Hanset, 1979). En animales de doble musculatura, el número (y consecuentemente la proporción) de fibras glicolíticas rápidas se incrementa significativamente. Debido a la mayor proporción de fibras glicolíticas rápidas, los músculos de los animales DM tienen un tamaño medio de fibra mayor que en los terneros normales (Batjoens et al., 1991, Uytterhaegen et al., 1994 y Gagniere et al., 1997) y se caracterizan por un alto contenido de glucógeno y una reducción en la mioglobina, el colágeno graso, la densidad capilar y el número de mitocondrias (Fiems, 2012). Esta última característica es altamente responsable de las concentraciones más bajas de oligoelementos

observadas en los músculos glicolíticos rápidos, el TR en nuestro estudio (Deveaux y Cassar_Malek, 2001; Lefaucheur, 2010).

Por otra parte, la hipertrofia muscular en el ganado adulto con DM no es uniforme en todo el cuerpo. Cuando se realizan comparaciones entre vacuno normal y con DM con un peso muscular constante, algunas regiones están hipertrofiadas, isotrofiadas e incluso hipotrofiadas (Boccard y Dumont, 1974). Esto depende de la cantidad de fibras tipo I (oxidativo), tipo IIA (oxidativo-glicolítico) e IIB (glicolítico) que hay en cada músculo (Hwang et al., 2010; McGilchrist et al., 2016). En concreto, dentro de los músculos analizados en nuestro estudio, las diferencias entre razas sólo se observaron en el músculo SM (el músculo más glicolítico y que tienen un gran potencial de hipertrofia en animales adultos de DM) y no se observaron diferencias en el TR (potencial de hipertrofia bajo) o DI (el músculo que junto con el masetero es más oxidativo, tiene una alta proporción de fibras de tipo I y está hipotrofiado en animales DM) (Boccard y Dumont, 1974; Talmant et al., 1986). El músculo CA (fibras α -tipo cardíacas) también se ve afectado en los animales DM. Los terneros de doble musculatura tienen el corazón un 20% más pequeño que los animales normales (Fiems, 2012). Picard et al. (1998) ha demostrado in vitro que en los mioblastos fetales bovinos la isoforma α -cardíaca estaba presente en mayores cantidades en fetos normales en todas las etapas y en todos los tipos celulares en comparación con los fetos DM. Además, Cassar-Malek et al. (2007) observaron una marcada disminución de la regulación de genes que codifican proteínas contráctiles lentas como tipo α -fibras cardíacas o troponina C en los músculos de los últimos fetos bovinos.

Como se ha indicado, la RG es la raza de carne por excelencia en la región del estudio, con alta presencia en el mercado nacional. Tiene un rendimiento muy alto de las canales (60%, con 55% extra y primeras categorías) y su carne tiene excelentes propiedades organolépticas. La homocigosis del gen de la miostatina, responsable del carácter de DM, está presente en el 55% de la población ensayada (más de 24000 animales, MAGRAMA, 2016), particularmente en machos (84% frente al 44% en hembras, Moreno et al., 2009). Posiblemente debido a la selección hecha por los ganaderos dejando los animales más musculosos como futuros toros. Desde el comienzo de la inseminación artificial, la RG se ha convertido en una de las razas más utilizada para los cruces industriales en las granjas lecheras, lo que ha contribuido al aumento del carácter de DM en la población de ganado de carne.

El fenómeno de DM no fue tenido en cuenta en el diseño experimental de nuestro estudio, por lo que nuestros resultados no pueden ser totalmente discutidos de esta manera. Sin embargo, las significativas correlaciones negativas entre el rendimiento de la canal (el punto final productivo más afectado por el carácter de DM) y las concentraciones de los principales oligoelementos sólo en el músculo SM (como se indica uno de los músculos más afectados por el fenómeno DM: Boccard y Dumont, 1974), parece apoyar indirectamente nuestra hipótesis: las concentraciones de oligoelementos significativamente más bajas en el músculo SM de los terneros RG y cruces (RGxHF) podrían estar relacionadas con una mayor proporción de fibras de tipo II (glicolíticas) en los terneros con mayor hipertrofia muscular.

Para Cu, a diferencia de los otros elementos traza, el escenario parece diferente. El efecto de la raza sólo es un factor significativo cuando se incluyó el rendimiento de la

canal en el análisis, y un patrón similar de la raza (HF> RGxHF> RG, aunque no significativo) se observó para las concentraciones de Cu en todos los músculos esqueléticos, lo que parece indicar como en estudios previos (Miranda, 2010), una menor capacidad para exportar Cu del hígado al músculo en razas de carne, lo que también podría contribuir a explicar nuestros resultados. Lo mismo fue aplicable para el Mo, aunque en este caso no se observaron diferencias entre razas en el músculo SM. El efecto significativo de la raza cuando el rendimiento de la canal fue incluido en el análisis (como covariable) podría estar relacionado con las interacciones significativas entre Cu y Mo en rumiantes (Suttle, 2010).

La información sobre la concentración de oligoelementos en los diferentes cortes de músculos en diferentes razas de vacuno, considerando su composición oxidativa/glicolítica (como se indicó anteriormente, relacionada con el fenómeno DM en razas muy musculadas) es muy escasa. La mayoría de los estudios que evalúan el efecto de la raza sobre la composición de oligoelementos de la carne de vacuno se realizaron en un único músculo, *Longissimus dorsi*, que no sufre hipertrofia en animales DM (Boccard y Dumont, 1974), y con resultados no concluyentes. Estudios más actuales, como los llevados a cabo por Holló et al. (2007) (estudiando las razas Gris Húngara y Frisona-Holstein) y Duan et al. (2015) (evaluando los terneros resultantes del cruzamiento por inseminación artificial de hembras de Angus o MARC III (1/4 Hereford, 1/4 Angus, 1/4 Red Poll y 1/4 Pinzgauer) con toros Hereford, Angus, Brangus, Beefmaster y Bonsmara) no encontraron diferencias entre razas en las concentraciones de oligoelementos en la carne (*Longissimus dorsi*). Pilarczyk (2014) encontró concentraciones menores de Cu, Zn, Mn y Fe en carne de toros de Charolais en comparación con Hereford y Simmental. De manera similar, Freitas et al. (2014) encontraron diferencias en las concentraciones de Fe y Zn en *Longissimus dorsi* entre Hereford, 1/4 Braford (1/4 Nelore, 3/4 Hereford) y 3/8 Braford (3/8 Nelore, 5/8 Hereford); los Hereford puros mostraron concentraciones más bajas (tanto cuando se terminan en pasto como en cebaderos). Sin embargo, pocos estudios han evaluado el efecto de la raza en varios tipos de músculos o cortes de carne a través de la canal. Por ejemplo, Cabrera et al. (2014) estudiaron el contenido de Se, Cu, Zn, Fe y Mn en siete cortes de carne (solomillo, lomo, redondo, babilla, falda, morrillo y pecho) de terneros Hereford y Braford alimentados con pastos. Se observaron diferencias significativas a lo largo de la canal (la babilla mostró mayor Cu y Zn y menos Fe que la mayoría de los cortes de carne), pero no entre las razas o la interacción entre ambos. Los resultados de este estudio son difíciles de interpretar en términos de composición muscular (oxidativo/glicolítico), ya que los cortes de carne incluyen diferentes músculos. Muy recientemente, Domaradzki et al. (2016) midieron Fe, Cu, Zn y Mn en los músculos *Longissimus lumborum* y *Semitendinosus* de terneros de cinco razas (Roja Polaca, Polaco Blanco, Polaco Blanco y Negro, Simmental y Frisona Polaca), y se encontraron diferencias significativas (excepto Mn) entre los músculos y las razas (pero no interacciones entre ambos factores). El músculo *Longissimus lumborum* mostró concentraciones significativamente más altas de Zn, Fe y Cu que el *Semitendinosus* (datos dados para todas las razas juntas). Para las razas (datos dados para ambos músculos juntos), la Frisona Polaca (aptitud de la leche) mostró la más alta (excepto Cu) y Simmental (aptitud de carne, posiblemente algunos animales con DM) las concentraciones más bajas (menos Mn) de oligoelementos. Por último, dos estudios (uno en terneros de aptitud leche y otro en carne) han considerado la influencia de las

propiedades oxidativas/glicolíticas de diferentes músculos de la canal sobre su composición de oligoelementos. Fue realizado por Czerwonka y Sterk (2015) en 9 músculos de toros Holstein-Friesian (*psaos major*, *longissimus dorsi*, *infraspinatus*, *triceps brachii*, *gluteus medius*, *rectus femoris*, *biceps femoris*, *gracilis* y *semimembranosus*). Las concentraciones más altas de Zn y Fe ($p < 0,05$) se encontraron en el *infraspinatus* (el músculo más oxidativo de los analizados, según Talmant et al (1986) y el más bajo (aunque no significativo) en el *psaos major* (el más glicolítico junto con *semimembranosus*). En un estudio en el que se evaluaron las concentraciones de oligoelementos (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se y Zn) en 12 tipos de músculo en terneros de raza RG, se observó que los cortes de músculo con una alta proporción de fibras oxidativas lentas (diafragma y corazón) mostraron concentraciones de elementos traza significativamente superiores a los cortes con fibras glucolítica rápidas (como el redondo o semitendinoso) (López-Alonso et al., 2016).

5. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que las diferencias entre razas observadas en las concentraciones de elementos traza en los músculos de nuestro estudio (limitadas al SM) están relacionadas principalmente con diferencias en su perfil oxidativo/glicolítico, si bien en el caso del Cu también contribuye la baja capacidad de exportar Cu del hígado hacia el músculo en las razas de aptitud de carne. Estas propiedades oxidativas/glicolíticas parecen estar relacionadas, al menos en parte, con el grado de hipertrofia de algunos músculos en razas muy musculadas (generalmente asociadas al fenómeno DM). Se necesitan nuevos estudios que analicen en diferentes razas (aptitud de leche o carne o cruces industriales) los niveles de elementos traza en una amplia selección de cortes de la canal, dependiendo de su capacidad oxidativa/glicolítica, para ofrecer a los consumidores la carne que mejor se adapte a sus necesidades nutricionales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (España) (PGIDIT04RAG261005PR y 07MRU030261PR). Los autores dan las gracias a Lucía Casanova Iglesias y al personal de la RIAIDT de la USC por el apoyo técnico.

REFERENCIAS

- Albretch E, Xu JX, Viergutz T, Nürnberg G, Zhao RQ, Wegner J. 2009. Expression of adipogenic genes in longissimus muscle and different adipose tissues of cattle representing either the accretion or the secretion type. In: Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Effects of Nutrition on reproduction and Welfare. Ed, Chilliard Y. et al. pp: 458-460.
- Ansay M, Hanset R. 1979. Anatomical, physiological and biochemical differences between conventional and double-muscled cattle in the Belgian Blue and White Breed. Livestock Production Science. 6: 5-13.
- Baldwin RL, McLeod KR, Capuco AV. 2004. Visceral tissue growth and proliferation during the bovine lactation cycle. Journal of Dairy Science. 87: 2977-2986.

Batjoens P, Fiems LO, Van Hoof J, Van Vooren T, Vereecke D. 1991. Myofibre composition and metabolic aspects in different strains of Belgian white-blue bulls and their relation to meat colour. In: Proceedings of the 37th International Congress of Meat Science and Technology, Kulmbach, Germany, 1-6 September 1991. pp: 324-327.

Bellmann O, Wegner J, Teuscher F, Schneider F, Voigt J, Derno M, Sauerwein H, Weingärtner J, Ender K. 2004. Beef versus dairy cattle: a comparison of metabolically relevant hormones, enzymes and metabolites. *Livestock Production Science*. 85: 41-54.

Biesalski HK. 2005. Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*. 70: 509-524.

Boccard R, Dumont BL. 1974. Conséquences de l'hypertrophie musculaire héréditaire des bovins sur la musculature. *Annales de Genetique et de Selection Animale*. 6(2): 177-186.

Cabrera MC, Ramos A, Saadoun A, Brito G. 2010. Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. *Meat Science*. 84: 518-528.

Cabrera MC, Saadoun A. 2014. An overview of the nutritional value of beef and lamb meat from South America. *Meat Science*. 98: 435-44.

Cassar-Malek I, Passelaigue F, Bernard C, Léger J, Hocquette JF 2007. Target genes of myostatin loss-of-function in muscles of late bovine fetuses. *BMC Genomics*. 8: 63.

Charlier C, Coppieters W, Farnir F, Grobet L, Leroy PL, Michaux C, Mni M, Schwes A, Vanmanshoven P, Hanset R, Georges M. 1995. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mammalian Genome*. 6: 788-792.

Czerwonka M, Szterk A. 2015. The effect of meat cuts and thermal processing on selected mineral concentration in beef from Holstein–Friesian bulls. *Meat Science*. 105: 75-80.

Da Costa ASH, Bessa RJB, Pires VMR, Rolo EA, Pinto RMA, Fontes CMGA, Prates JAM. 2014. Is hepatic lipid metabolism of beef cattle influenced by breed and dietary silage level? *BMC Veterinary Research*. 10: 65. <http://doi.org/10.1186/1746-6148-10-65>.

De Freitas AK, Lobato JF, Cardoso LL, Tarouco JU, Vieira RM, Dillenburg DR, Castro I. 2014. Nutritional composition of the meat of Hereford and Braford steers finished on pastures or in a feedlot in southern Brazil. *Meat Science*. 96(1): 353-360

Deveaux V, Cassar-Malek I, Picard P. 2001. Comparison of contractile characteristics of muscle from Holstein and Double-Muscled Belgian Blue fetuses. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 131: 21-29.

Domaradzki, P., Florek, M., Staszowska, A., Litwińczuk, Z. 2016. Evaluation of the Mineral Concentration in Beef from Polish Native Cattle. *Biological Trace Element Research*, 171 82): 328-332.

Duan Q, Tait Jr RG, Schneider MJ, Beitz DC, Wheeler TL, Shackelford SD, Cundiff LV, Reecy JM. 2015. Sire breed effect on beef longissimus mineral concentrations and their relationships with carcass and palatability traits. *Meat Science*. 106: 25-30.

Fiems, LO. 2012. Double Muscling in Cattle: Genes, Husbandry, Carcasses and Meat. *Animals*. 2(3): 472.

Gagnière H, Ménessier F, Geay Y, Picard B. 2000. Influence of genotype on contractile protein differentiation in different bovine muscles during foetal life. *Annales de Zootechnie*. 49: 405-423.

Gagnière H, Picard B, Jurie C, Geay Y. 1997. Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-musced cattle. *Meat Science*. 45: 145-152.

Gil M, Serra X, Gispert M, Angels Oliver M, Sanudo C, Panea B, Olleta JL, Campo M, Oliván M, Osoro K, García-Cachan MD, Cruz-Sagredo R, Izquierdo M, Espejo M, Martín M, Piedrafita J. 2001. The effect of breed-production systems on the myosin heavy chain 1, the biochemical characteristics and the colour variables of Longissimus thoracis from seven Spanish beef cattle breeds. *Meat Science*. 58(2): 181-188.

Girgenrath S, Song K, Whittemore LA. 2005. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 31: 34-40.

Greenwood PL, Gardner GE, Hegarty RS. 2006. Lamb myofibre characteristics are influenced by sire estimated breeding values and pastoral nutritional system. *Australian Journal of Agricultural Research*. 57(6): 627-639.

Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, Menissier F, Zanotti M, Dunner S, Georges M. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammalian Genome*. 9: 210-213.

Grobet L, Royo Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. 1997. A deletion in the myostatin gene causes double muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*. 17: 71-74.

Holló G, Nuernberg K, Holló I, Csapó J, Seregi J, Repa I, Ender K. 2007. Effect of feeding on the composition of longissimus muscle of Hungarian Grey and Holstein Friesian bulls. III Amino acid composition and mineral content. *Archiv Tierzucht*. 50(6): 575-586.

Hwang YH, Kim GD, Jeong JY, Hur SJ, Joo ST. 2010. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Science*. 86: 456-461.

Karlsson AH, Klont RE, Fernandez X. 1999. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science*. 60(2-3): 255-269.

Kühn C, Bellmann O, Voigt J, Wegner J, Guiard V, Ender K. 2002. An experimental approach for studying the genetic and physiological background of nutrient transformation in cattle with respect to nutrient secretion and accretion type. *Archiv Tierzucht*. 45: 317-330.

Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, Picard B, Bugeon J. 2016. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *The Scientific World Journal*. Article ID 3182746, 14 pages.

López-Alonso M, Miranda M, Benedito JL, Pereira V, García-Vaquero M. 2016. Essential and toxic trace element concentrations in different commercial veal cuts in Spain. *Meat Science*. 121: 47-52.

MAGARAMA, 2016. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/bovino/rubia-gallega/usos_sistema.aspx

Mateescu RG, Garmyn AJ, Tait RG, Duan Q, Liu Q, Mayes MS, Garrick DJ, van Eenennaam AL, Van Overbeke DL, Hilton GG, Beitz DC, Reecy JM. 2013. Genetic parameters for concentrations of minerals in longissimus muscle and their associations with palatability traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*. 91: 1067-1075.

McGilchrist P, Greenwood PL, Pethick DW, Gardner GE. 2016. Selection for increased muscling in Angus cattle did not increase the glycolytic potential or negatively impact pH decline, retail colour stability or mineral content. *Meat Science*. 114: 8-17.

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*. 387: 83-90.

McPherron AC, Lee S.J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 12457-12461.

Miranda M, Gutiérrez B, Benedito JL, Blanco-Penedo I, García-Vaquero M, López-Alonso M. 2010. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Archives of Animal Nutrition*. 64(2): 98-110.

Moreno A, Viana JL, Sánchez L, Iglesias A. 2009. Relationship with the double-muscling phenotype in "Rubia Gallega" cattle breed. Book of abstracts of the 60th annual meeting of the European Association for Animal Production.

Morris CA, Bottema CD, Cullen NG, Hickey SM, Knowles SO, Pitchford WS. 2013. Effects of quantitative trait loci and the myostatin locus on trace and macro elements (minerals) in bovine liver, muscle and kidney. *Animal Genetics*. 44: 361-8.

Mortimer SI, van der Werf JHJ, Jacob RH, Hopkins DL, Pannier L, Pearce KL, Gardner GE, Warner RD, Geesink GH, Hocking Edwards JE, Ponnampalam EN, Ball AJ, Gilmour AR, Pethick DW. 2014. Genetic parameters for meat quality traits of Australian lamb meat. *Meat Science*. 96: 1016-1024.

Oliván M, Martínez A, Osoro K, Sañudo C, Panea P, Olleta JL, Campo MM, Oliver MA, Serra X, Gil M, Piedrafita J. 2004. Effect of muscular hypertrophy on physicochemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Science*. 68: 567-575.

Pereira V, Carbajales P, López-Alonso M, Miranda M. 2017. Effect of breed on trace element concentrations in beef cattle reared on intensive systems. *Biological Trace Element Research*. In press.

Pfuhl R, Bellmann O, Kühn C, Teuscher F, Ender K, Wegner J. 2007. Beef versus dairy cattle: a comparison of feed conversion, carcass composition, and meat quality. *Archiv Tierzucht*. 50: 59-70.

Picard B, Cassar-Malek I. 2009. Evidence for expression of IIB myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Science*. 82(1): 3-36.

Picard B, Depreux F, Geay Y. 1998. Muscle differentiation of normal and double-muscling bovine foetal myoblasts in primary culture. *Basic and applied myology: BAM*. 8: 197-203.

Pilarczyk R. 2014. Concentrations of toxic and nutritional essential elements in meat from different beef breeds reared under intensive production systems. *Biological Trace Element Research*. 158: 36-44.

Ramos A, Cabrera MC, Saadoun A. 2012. Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn and Fe, and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Braford steers fed pasture. *Meat Science*. 91: 116-124.

Ruusunen M, Puolanne E. 2005. Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*. 70: 531-541.

Schönfeldt HC, Naudé RT, Boshoff E. 2010. Effect of age and cut on the nutritional content of South African beef. *Meat Science*. 86: 674-683.

Somogyi T, Holló I, Csapó J, Anton I, Holló G. 2015. Mineral content of three several muscles from six cattle genotypes. *Acta Alimentaria*. 44(1): 51-59.

Suttle NF. 2010. Mineral nutrition of livestock. 4th edition. Cabi Publishing, Wallingford, UK.

Talmant A, Monin G, Briand M, Dadet M, Briand Y. 1986. Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscles. *Meat Science*. 18(1): 23-40.

Uytterhaegen L, Claeys E, Demeyer D, Lippens M, Fiems LO, Boucqué CV, Van de Voorde G, Bastiaens A. 1994. Effects of double-muscling on carcass quality, beef tenderness and myofibrillar protein degradation in Belgian Blue White bulls. *Meat Science*. 38: 255-267.

Vissac, B. 1968. Étude du caractère culard. II. Incidence du caractère culard sur la morphologie générale des bovins. *Annales de Zootechnie*. 17: 77-101.

Wegner J, Albrecht E, Fiedler I, Teuscher F, Papstein HJ, Ender K. 2000. Growth and reed related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*. 78: 1485-1496.





3.3

Distribución subcelular del cobre hepático en terneros de carne suplementados con altos niveles de cobre

Adaptado de:

López-Alonso M, Carbajales P, Miranda M and Pereira V. 2017. Subcellular distribution of hepatic copper in beef cattle receiving high copper supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 42: 111-116.

RESUMEN

Estudios previos realizados en terneros de cebo en el noroeste de España han revelado una mayor acumulación de cobre (Cu) en el hígado de animales de raza Frisona (HF) que de Rubia Gallega (RG) o del cruce RGxHF al recibir una dieta suplementada con la concentración máxima de Cu permitida en la legislación de la UE (35 mg/kg). Este estudio tiene como objetivo evaluar si esta diferencia se debe al patrón de acumulación subcelular de Cu en el hígado. Para ello se analizaron muestras de hígado de 10 terneros de raza RG, 9 de raza HF y 10 de cruce de RGxHF para determinar el contenido de metalotioneínas (MT), Cu y zinc (Zn) (en el hígado (hígado Cu y hígado Zn) y su unión con metalotioneínas (Cu - MT y Zn - MT)). También se determinó la distribución del Cu dentro de los principales compartimentos subcelulares (núcleos, gránulos grandes, microsomas y citosol). A pesar de que los animales HF mostraron concentraciones de Cu significativamente más altas ($P < 0,05$) en el hígado (161 ± 10 mg/kg de peso húmedo) en comparación con RG (132 ± 8 mg/kg), no se observaron diferencias relacionadas con la raza en ningún otro parámetro analizado en este estudio. En general, el patrón de acumulación hepática a nivel subcelular fue similar al descrito anteriormente en vacuno: (i) las concentraciones de MT fueron menores que en otras especies animales, pero muy relacionadas con el Zn hepático; (ii) un bajo porcentaje de Cu (6,61%) se unió a MT pero esto se relacionó muy negativamente con la relación Cu:Zn en las células hepáticas; y (iii) la mayor proporción de Cu (57,3%) se encontró en la fracción de gránulos grandes (con contenido de lisosomas). Todos estos resultados indican una baja capacidad de los bovinos para excretar Cu por la bilis, dando como resultado una alta acumulación de Cu en las células hepáticas.

Palabras clave: acumulación de cobre, hígado, metalotioneínas, distribución subcelular, vacuno de carne, sistemas intensivos, zinc.

1. INTRODUCCIÓN

La suplementación con oligoelementos o elementos traza se ha utilizado de forma rutinaria en la industria de los piensos sin tener en cuenta sus concentraciones en las materias primas. Esto ha conducido a dar cantidades de oligoelementos que exceden en gran medida las necesidades fisiológicas de los animales (López-Alonso, 2012). Sin embargo, en los últimos años la filosofía de la suplementación con elementos traza ha cambiado sustancialmente. Además de considerar la eficacia de la suplementación con oligoelementos en relación con la salud animal y su rendimiento, es importante asegurar su inocuidad para los consumidores (a través de los alimentos de origen animal) y los niveles máximos de acumulación en el medio ambiente (EFSA, 2012a).

Para comprender los problemas asociados con la suplementación excesiva de oligoelementos tenemos el ejemplo de las necesidades de cobre (Cu) en los animales, particularmente en rumiantes. La deficiencia de Cu es muy frecuente en los rumiantes en todo el mundo (Suttle, 2010) y muchos animales se benefician de la adición de Cu en su dieta. Sin embargo, si las cantidades de Cu suministradas superan las necesidades fisiológicas, pueden acumularse grandes cantidades en el hígado, lo que podría conducir

a una toxicidad crónica de Cu (López-Alonso, 2008). Esto tiene consecuencias para el consumidor, y se han propuesto límites máximos reglamentarios (LMR) para abordar este problema (EFSA, 2012b).

Estudios previos en terneros de cebo en el NO de España (Miranda et al., 2006) han mostrado que los terneros de raza Frisona (HF) acumulan mayores concentraciones de Cu en el hígado que los de Rubia Gallega (RG) o el cruce RGxHF. Además, en un porcentaje considerable de terneros HF (42%), las concentraciones hepáticas de Cu están por encima de los niveles recomendados (Miranda et al., 2006). Esto puede tener consecuencias para la salud animal ya que se observa un daño oxidativo (García-Vaquero et al., 2011) y pueden suponer un riesgo para el consumidor. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios recientes en Europa que muestran que la toxicidad crónica subclínica de Cu en vacuno es más frecuente de lo que generalmente se supone (Bidewell et al., 2012). Esto plantea un problema en la nutrición animal.

Las ovejas son particularmente susceptibles a la intoxicación crónica con Cu, y por ello el metabolismo hepático de Cu ha sido profundamente estudiado en esta especie (Gooneratne et al., 1979; Kumaratilake y Howell, 1989). Se cree que esta susceptibilidad está relacionada con el hecho de que el hígado de la oveja no puede acumular grandes cantidades de Cu unido a metalotioneínas (Cu-MT). En los mamíferos, el Cu absorbido en el intestino generalmente se transporta al hígado, donde se utiliza en el metabolismo normal de los hepatocitos, se almacena como Cu-MT o, si está presente en exceso, se excreta en la bilis (Bremner, 1991). Las metalotioneínas (MT) parecen desempeñar un papel importante en la excreción de Cu por la bilis, tanto por una vía directa a través del citoplasma de los hepatocitos o, más importante, por la vía hepatolisosomal, en la que el Cu-MT es secuestrado por los lisosomas para su excreción por la bilis (Gooneratne et al., 1989a). Si llega una elevada cantidad de Cu al hígado, puede verse superada la capacidad de las MT para unirse al Cu y la capacidad de los lisosomas para eliminar el Cu del citosol. El Cu se acumula a mayor velocidad en otros orgánulos (principalmente en el núcleo) o, cuando se almacenan concentraciones excesivamente altas de Cu, puede permanecer en el citosol como iones de Cu libres. En ambos casos el Cu es responsable de importantes alteraciones en la estructura del hígado y de su funcionamiento (Bremner, 1991; Bremner, 1998).

Las distintas razas de ovejas muestran grandes diferencias en el metabolismo del Cu, y algunas de ellas incluso han sido identificadas como resistentes o tolerantes al Cu (Suttle, 2010). Estas diferencias parecen estar relacionadas con la capacidad del animal para excretar Cu por la bilis (Saylor y Leach, 1980). En ganado vacuno se han descrito algunas diferencias relacionadas con la raza y las necesidades de Cu, atribuidas a diferencias en la excreción biliar del Cu (las razas Simmental y Charolaise parecen tener mayores necesidades de Cu que la Aberdeen Angus (Gooneratne et al., 1989b)), a pesar de ello existen escasos estudios sobre el metabolismo subcelular del Cu hepático.

El objetivo de este estudio fue determinar si el patrón de acumulación subcelular hepático del Cu explica la mayor acumulación hepática de Cu observada en HF que en RG. Para ello, se evaluará el papel de las MT en la unión de Cu y se analizará la distribución subcelular del Cu en los diferentes compartimentos hepáticos en HF, RG y el cruce RGxHF.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Muestras de hígado

En este estudio se utilizaron muestras de hígado de 10 terneros de raza RG, 9 de HF y 10 de sus cruces RGxHF, obtenidas de un estudio previo dónde se evaluaron los niveles de Cu en animales alimentados con dietas ricas en Cu. Estos terneros se criaron de las 12 hasta las 36 semanas de vida (rango de peso corporal de aproximadamente 130-390) en un cebadero y se alimentaron con una dieta concentrada que contenía un suplemento mineral estándar (Co (0,5), Fe (32), I [15], Mn (40), Se (0,1) y Zn (32) mg/kg de concentrado) con el nivel máximo de suplementación de Cu permitida por la legalización de la Unión Europea (35 mg de Cu como sulfato de cobre/kg de pienso). Para más detalles sobre los animales y la dieta, véase Miranda et al. (2010). Se tomaron muestras del lóbulo caudado del hígado inmediatamente después de sacrificar a los animales a las 36 semanas de edad. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C antes de ser procesadas.

2.2. Fraccionamiento subcelular

Se homogeneizó aproximadamente 1 g de hígado en 6 volúmenes de sacarosa 0,25 M (pH 8, 4°C) con un homogeneizador Potter-Elvehjem. El material se fraccionó siguiendo el método descrito por Corbett et al. (1978). En resumen, el homogeneizado se centrifugó (centrifugadora Beckham, modelo J2-21) a 600 g durante 10 minutos para separar el sedimento nuclear (núcleos, membranas plasmáticas, células enteras) y el sobrenadante resultante se centrifugó a 8500 g durante 12 minutos para separar los grandes gránulos (mitocondrias y lisosomas). El sobrenadante obtenido en esta etapa se centrifugó (ultracentrífuga Beckman, modelo L7-80, rotor 70 Ti) a 105000 g durante 60 minutos para separar el sedimento microsomal (retículo endoplasmático, aparato de Golgi, ribosomas) del citosol (incluyendo el Cu-MT, otras proteínas solubles e iones libres). Siguiendo el protocolo descrito por Corbett et al. (1978) se realizaron análisis enzimáticos para confirmar la eficacia del procedimiento de fraccionamiento.

2.3. Análisis de MT

La MT se determinó mediante una modificación del método de separación de la plata (Ag) (Scheuhammer y Cherian, 1991). En resumen, primero se ajustaron alícuotas de entre 0,1 y 0,5 ml de citosol hepático a un volumen de muestra de 2,4 ml con glicina 0,5 M pH 8,5. A continuación se mezclaron con 1 ml de solución de AgNO₃ (20 µg Ag/mL de tampón de glicina). Para garantizar la saturación completa de las muestras se utilizaron varias alícuotas de la misma. Para conseguir retirar el exceso de Ag se le añadieron 0,2 ml de una solución de hemoglobina al 2% (en tampón) para que precipitase. Después se trató térmicamente la solución en un baño de agua (aproximadamente 100 °C durante 1 min) y se centrifugó a 1000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Estos pasos se repitieron dos veces más. La fracción sobrenadante final se analizó para determinar la cantidad de Ag por ICP-OES, y las

concentraciones de MT se calcularon asumiendo una relación molar de Ag (I) / MT de 17 (Scheuhammer y Cherian, 1991).

2.4. Contenido de metales en el hígado, ligado a MT y a otras fracciones subcelulares

Para determinar las concentraciones de Cu y Zn en el hígado se digirieron, empleando un microondas, 0,5 g de tejido con ácido nítrico concentrado (Suprapur, Merck) y peróxido de hidrógeno.

Las fracciones presentes en el sobrenadante del hígado después del tratamiento térmico se asume que eran el Cu y Zn unido a las MT (Cu-MT, Zn-MT) (Suzuki et al., 1994). El sobrenadante se obtuvo calentando primero (72 °C durante 5 min) y luego enfriando (en un baño de hielo) un ml de citosol de hígado. Las proteínas desnaturalizadas por el calor se eliminaron centrifugando a 1600 g durante 5 minutos y el sobrenadante final se analizó por espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Perkin Elmer Optima 4300 DV, Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, EE.UU.).

Las submuestras (0,5-1 ml) de homogeneizado hepático y de fracciones subcelulares se digirieron en 1 ml de ácido nítrico concentrado al 69% y 0,2 ml de peróxido de hidrógeno al 33% p/v. Las muestras digeridas se pasaron a tubos de muestra de polipropileno y se diluyeron con 5 ml de agua destilada Milli-Q. Las concentraciones de metales en la digestión fueron determinadas por ICP-OES.

2.5. Control de calidad analítica

Se llevó a cabo un programa de control de calidad analítica durante todo el estudio. Se analizaron dos blancos junto con las muestras de referencia (homogeneizado de hígado de vacuno a - 80° C) con cada lote de 6 muestras para detectar cualquier contaminación de fondo y para controlar la homogeneidad del análisis entre lotes. También se analizó el material de referencia certificado (Standard Reference Material® 1577c Hígado de Bovino, Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) con cada lote de muestras para determinar la recuperación analítica. Se restaron los valores de absorbancia en blanco de las lecturas antes de calcular las concentraciones finales. Los límites de detección (LoD) en la digestión ácida, se calcularon como tres veces la desviación estándar de los blancos y fueron de 5,9 y 3,4 µg/L para Cu y Zn, respectivamente. Las concentraciones de Cu y Zn en todas las subfracciones analizadas estuvieron por encima de la LoD. Los límites de cuantificación (LoQ), expresados como una concentración en el tejido y basados en el peso medio de la muestra, fueron 7,22 (MT), 0,203 (Cu-MT), 0,284 (Cu-hígado), 0,098 (Zn-MT) y 0,127 (hígado de Zn) mg/kg de peso húmedo (PH). Las concentraciones en todas las muestras estaban por encima de la LoQ. La precisión del método global se calculó como la desviación estándar relativa (% RSD) de las lecturas de absorbancia de la muestra de referencia. Estos valores variaron entre el 4,9% y el 9%. Los resultados (media±DE) del SRM fueron de 97,7±4,7% para Cu y 98,4±7,5% para Zn.

2.6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS para Windows (vs 20.0). Una muestra de hígado mostró una concentración de MT identificada como un valor atípico (542 mg/kg) y se retiró del análisis. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si los datos se distribuían normalmente. Para examinar la influencia de la raza en las concentraciones en el hígado de MT, Cu y Zn y dentro de las diferentes fracciones subcelulares se realizó un test de ANOVA y pruebas post-hoc de Tukey. El análisis de regresión se utilizó para evaluar las relaciones entre (i) las concentraciones hepáticas de MT, y de Cu y Zn (tanto en el hígado como unidos a MT), (ii) la relación Cu: Zn en el hígado y la proporción de metales ligados a MT y (iii) Cu en el hígado y Cu en los diferentes compartimentos subcelulares. En el texto y en las tablas los resultados se muestran como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

La **Tabla 1** muestra el contenido hepático de MT, Cu, Zn. Cu-MT y Zn-MT en los terneros de razas HF, RG y sus cruces RGxHF. Las concentraciones de Cu en el hígado fueron significativamente más altas ($P = 0,028$) en HF que en RG y fueron intermedias en el cruce RGxHF. Todos los animales mostraron mayores concentraciones de Cu de los niveles adecuados (25-100 mg/kg PH; (Puls, 1994)) y el 66, 20 y 60% de las muestras hepáticas de HF, RG y RGxHF superaron respectivamente el LMR (140 mg/kg PH) para el consumo humano (EFSA, 2012b). No se observaron diferencias relacionadas con la raza para las concentraciones de Zn en el hígado, todos los animales tuvieron concentraciones hepáticas de Zn dentro del rango fisiológico (25-100 mg/kg PH; (Puls, 1994)).

Tabla 1. Contenido de metalotioneínas en hígado (MT) y de cobre y zinc contenido en el hígado (Cu-hígado and Zn-hígado) y unido a metalotioneínas (Cu-MT and Zn-MT)) en Frisona (HF), Rubia Gallega (RG) y sus cruces (RGxHF). Los datos se muestran como la media \pm SEM. Los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$)

	HF (n=9)	RG (n=10)	RGxHF (n=10)	P
MT (mg/kg PH)	177 \pm 48	114 \pm 10	132 \pm 8	0.222
Cu-hígado (mg/kg PH)	161 \pm 10 ^a	132 \pm 8 ^b	154 \pm 6 ^{ab}	0.028
Cu-MT (mg/kg PH)	12.53 \pm 3.91	6.62 \pm 0.88	8.62 \pm 1.14	0.201
%Cu-MT*	7.51 \pm 1.90	5.09 \pm 0.64	5.65 \pm 0.72	0.336
Zn-hígado (mg/kg PH)	44.9 \pm 5.5	38.7 \pm 1.1	40.5 \pm 1.4	0.370
Zn-MT (mg/kg PH)	4.47 \pm 1.01	4.21 \pm 0.88	3.79 \pm 0.46	0.878
%Zn-MT*	9.50 \pm 1.40	11.02 \pm 2.45	9.24 \pm 0.95	0.734

*%Cu-MT y % Zn-MT: expresados como porcentaje de Cu o de Zn contenido en el hígado
PH: peso húmedo

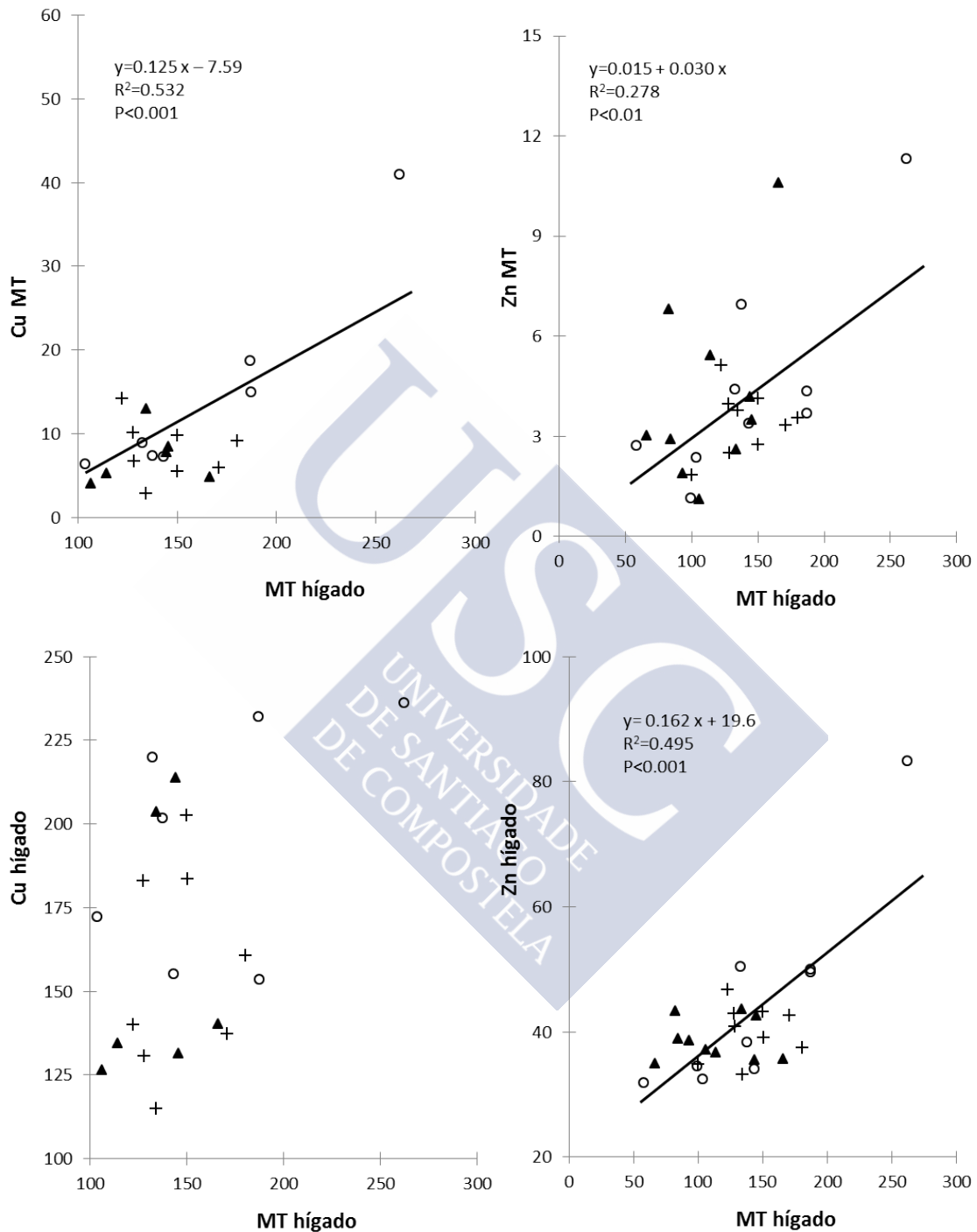


Fig. 1. Relación entre la concentración de metalotioneínas en hígado (MT, mg/kg en hígado) y las concentraciones de Cu y Zn (mg/kg hígado) en el hígado y unidades a MT. (o: Frisona (HF); ▲: Rubia Gallega (RG); +: cruces RGxHF).

Las concentraciones de MT variaron ampliamente (oscilando entre 58 y 262 mg/kg de PH). Las concentraciones medias de MT fueron superiores en HF que en RG y fueron intermedias en los cruces RGxHF, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$). El mismo patrón se encontró al considerar las concentraciones de Cu-MT y Zn-MT: las concentraciones medias fueron numéricamente más altas en HF que en RG e intermedias en los cruces ($P > 0,05$).

La **Figura 1** muestra la relación entre las MT hepáticas y el Cu y Zn en el hígado (en la parte inferior) y unido a MT (parte superior de la figura). Las concentraciones de MT no se correlacionaron con el contenido de Cu del hígado ($R^2=0,06$, $P > 0,05$), pero se correlacionaron fuertemente con el Zn ($R^2=0,495$, $P < 0,001$). Sin embargo, la unión Cu-MT ($R^2=0,532$, $P < 0,001$) y Zn-MT ($R^2=0,278$, $P < 0,01$) se correlacionó positivamente con las concentraciones de MT; estos resultados indican que aunque el Cu es un pobre inductor de la síntesis de MT, puede unirse a las MT compitiendo con el Zn por los sitios de unión.

Se observaron grandes variaciones individuales en la proporción (en % del elemento total) de Cu y Zn ligados a MT (que variaron entre el 2,1 y el 19,6% para Cu-MT y del 3,0 al 29,8% para Zn-MT), aunque no estaban relacionados con la raza ($P > 0,05$, Tabla 1). El % Cu-MT estaba fuertemente relacionado con la relación Cu:Zn (en peso) en el hígado (**Fig. 2**). Cuando las proporciones de Cu:Zn eran de 2:3 el 5-20%, del Cu total en el hígado se unió a MT, pero este porcentaje disminuyó por debajo del 2-5% al aumentar la relación Cu:Zn, aproximadamente en un 4:6.

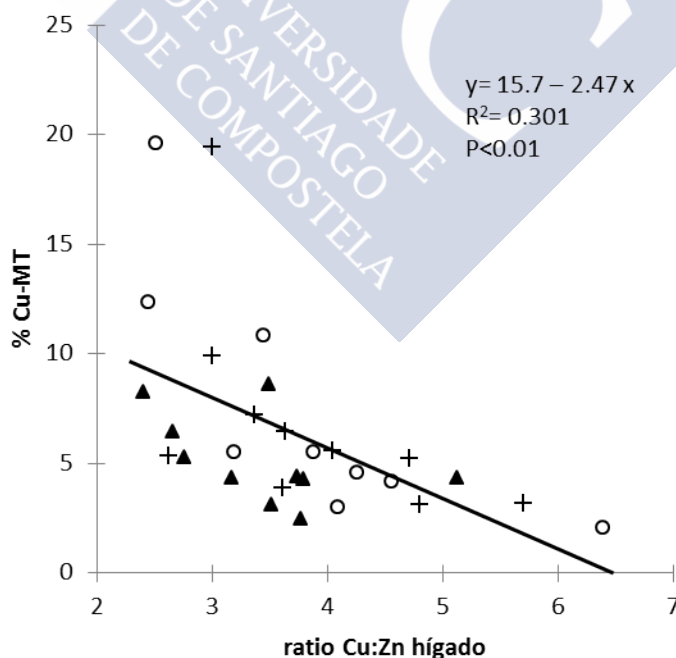


Fig. 2. Relación entre la proporción (%) de Cu unido a metalotioneínas (MT) de la concentración hepática de cobre y el ratio Cu:Zn (por peso) en el hígado. (o: Frisona (HF); ▲: Rubia-Gallega (RG); +: cruces RGxHF).

La **Tabla 2** muestra las concentraciones de Cu (expresadas como % de la concentración del elemento en el hígado) en los diferentes compartimentos subcelulares (núcleos, gránulos grandes, microsomas y citosol) para las tres razas. Al igual que para Cu-MT, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación con la raza ($P > 0,05$ en todos los casos). En general, la fracción granular fue el principal compartimento para el almacenamiento de Cu (42,2%), seguido por el citosol (31,2%) y los núcleos (15,4%), mientras que la menor proporción (11,2%) estaba contenida en la fracción microsomal.

Tabla 2. Distribución subcelular de cobre (Cu) en los principales compartimentos (nucleo, gránulos grandes, microsomas and citosol) (expresados como porcentaje de Cu contenido en el) en Frisona (HF), Rubia Gallega (RG) y sus cruces (RGxHF). Los datos se muestran como la media aritmética \pm SEM.

	HF (n=9)	RG (n=10)	RGxHF (n=10)	P
%Cu-núcleo	18.1 \pm 1.5	14.0 \pm 0.9	16.1 \pm 1.7	0.219
%Cu-gránulos grandes	41.4 \pm 3.2	41.1 \pm 2.0	42.2 \pm 2.1	0.763
%Cu-microsomas	9.6 \pm 0.9	12.4 \pm 0.9	11.2 \pm 1.2	0.587
%Cu-citosol	30.9 \pm 2.6	32.5 \pm 1.7	30.6 \pm 1.6	0.738

El análisis de la distribución subcelular hepática en relación con el almacenamiento de Cu en el hígado (**Fig. 3**) reveló un patrón similar en todas las partes. La concentración de Cu en los núcleos, gránulos grandes, microsomas y en el citosol aumentó con la carga hepática de Cu.

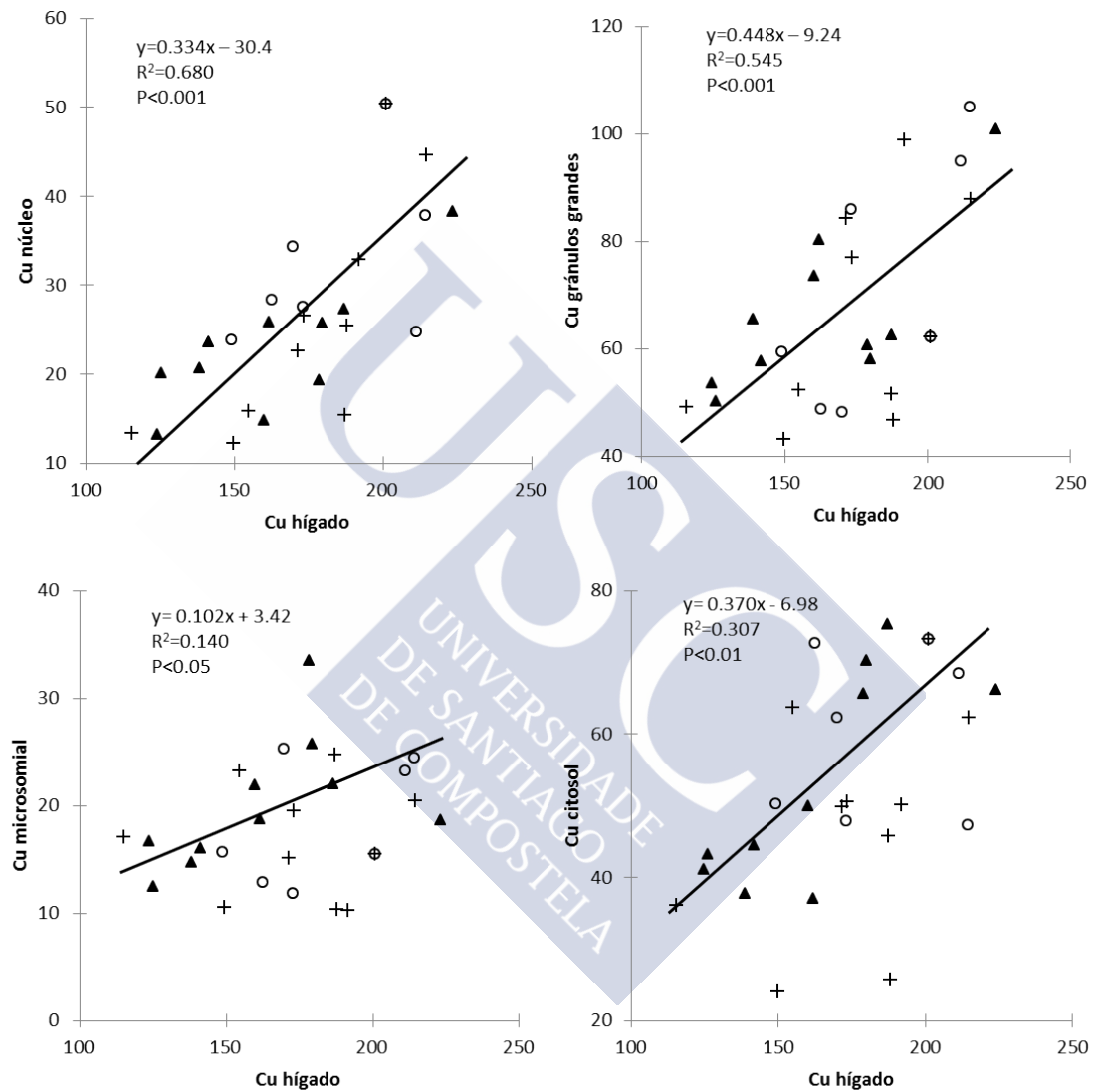


Fig. 3. Relación entre la concentración de Cu (mg/kg hígado) en las principales fracciones subcelulares (núcle, gránulos grandes, microsomas y citosol) frente a las concentraciones hepáticas de cobre. (o: Frisona (HF); ▲: Rubia-Gallega (RG); +: cruces (RGxHF)).

4. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio experimental, realizado en terneros de cebo que recibieron una dieta estándar con el nivel máximo de suplementación de Cu permitido por la legislación de la UE (35 mg/kg de pienso, (EC, 2013), muestran un patrón muy similar de acumulación hepática de Cu al previamente descrito en terneros expuestos de forma natural a concentraciones relativamente altas de Cu y Zn por una alimentación en pastos tratados con purines de cerdo (López-Alonso et al., 2005a; López-Alonso et al., 2005b). Las concentraciones de MT medias en los animales del presente estudio fueron más bajas que las reportadas para otras especies animales (Henry et al., 1994) y también altamente dependientes de los niveles de Zn en los animales (Bremner y Beattie, 1995). Se sabe que el Cu tiene una capacidad baja para inducir a las MT, aunque, como se demuestra en nuestro estudio, puede competir eficientemente con el Zn por los sitios de unión a las MT (Bremner y Beattie, 1995; Bremner, 1998). Debido a las bajas concentraciones de MT en vacuno, la proporción de Cu y Zn unido a MT (del metal total presente en el hígado) fue muy baja (6,6 y 9,9%) con respecto al total de la concentración hepática de Cu y Zn, en comparación con otras especies tolerantes al Cu (como por ejemplo: el 60% en cerdos no expuestos a Cu y hasta el 80% en cerdos expuestos (Bremner, 1991)). Además, la cantidad de Cu-MT estaba estrechamente relacionada con la relación Cu:Zn en las células hepáticas (López-Alonso et al., 2005a); lo que significa que los bovinos, además de tener una baja capacidad de unión del Cu a las MT y a ser eliminado a través de la bilis, esta capacidad disminuye en gran medida al aumentar la carga hepática de Cu (y por consiguiente la relación Cu:Zn). Esto puede ser importante, ya que la excreción biliar de Cu en los rumiantes, particularmente en ovejas, es altamente dependiente de la unión del Cu a las MT (Saylor y Leach, 1980).

No se observaron diferencias relacionadas con la raza en las concentraciones de MT o en la proporción de Cu y Zn unidos a MT que pudieran explicar la mayor acumulación hepática de Cu observada en terneros HF. Las concentraciones de MT fueron muy variables dentro de los tres grupos de animales, sobre todo teniendo en cuenta que las concentraciones de MT son muy dependientes de las concentraciones de Zn en la dieta (y por consiguiente hepáticas) (Bremner y Beattie, 1995; Bremner, 1998) y que todos los animales en el presente estudio recibieron la misma dieta estándar (32 mg Zn/kg de alimento) durante todo el experimento. Sin embargo, otros factores como la edad, el sexo, el estado hormonal (Bremner y Beattie, 1995), el estrés y los estímulos a procesos infecciosos afectan fuertemente a las concentraciones de MT. Además de regular el metabolismo del Cu y Zn, las MT también juegan un papel importante los mecanismos de defensa biológica: en la desintoxicación de metales pesados y en la eliminación de radicales libres (Nordberg, 1998).

El patrón de distribución observado dentro de los compartimentos subcelulares en el presente estudio también fue muy similar al descrito en estudios previos en rumiantes suplementados con Cu. La fracción de gránulos grandes fue el compartimento principal donde se acumuló el Cu, seguido por el citosol y los núcleos, mientras que la concentración de Cu en la fracción microsomal fue muy baja (Gooneratne et al., 1979; Saylor y Leach, 1980; Kumaratilake y Howell, 1989). Este patrón contrasta con el observado en especies tolerantes al Cu, como el cerdo, en el que la mayor parte del Cu se acumula en el citosol (Mehra y Bremner, 1984; Bremner y Beattie, 1990).

La concentración de Cu en las cuatro fracciones aumentó a medida que aumentaba la carga de Cu en el hígado. En dietas como la del presente estudio, con un alto contenido de Cu, se sobrecarga la capacidad de excreción biliar del Cu, y aumenta su tasa de acumulación en la fracción de gránulos grandes. Una vez alcanzada la fase de meseta, el Cu empieza a entrar en el núcleo o permanece libre en el citosol, causando un daño oxidativo importante. En nuestro estudio, la acumulación de Cu sigue un aumento lineal en todos los compartimentos subcelulares, lo que indica que no se alcanzó la fase de meseta en la que hay un gran riesgo de crisis hemolítica (López-Alonso, 2008).

No se observaron diferencias entre las razas estudiadas en la proporción de Cu en cada compartimiento subcelular ni en la forma en la que el Cu se distribuyó en cada compartimento al aumentar la carga de Cu. Se cree que la susceptibilidad de las ovejas a la toxicidad del Cu y sus diferencias entre razas están relacionadas con una capacidad limitada de los lisosomas (fracción de gránulos grandes) para excretar Cu a través de la bilis (Woolliams et al., 1983), principalmente porque el cobre ligado a proteínas no está disponible para su secuestro (Saylor y Leach, 1980). En los escasos estudios existentes en ganado vacuno, la excreción biliar de Cu en la raza Simmental ha resultado ser al menos dos veces mayor que en la raza Aberdeen Angus en condiciones nutricionales similares (Gooneratne et al., 1994). Cuando el Cu no se excreta por la bilis, se almacena en el citoplasma hepatocelular y en los lisosomas unido a las MT (Gooneratne et al., 1989b; Bremner, 1991). Si la mayor acumulación hepática de Cu en los terneros HF observada en este estudio se explicaba por una menor capacidad de excreción biliar del Cu, se esperaría un mayor porcentaje de Cu la fracción de gránulos grandes (conteniendo lisosomas) de los hepatocitos que en RG. Sin embargo, no hubo diferencias raciales en la acumulación de Cu en los gránulos grandes ni en el Cu detectado en las otras tres fracciones subcelulares (Tabla-2). Sin embargo, debemos considerar que en nuestro estudio sólo se usó una dosis única de Cu (el máximo permitido en nutrición animal por la legislación de la UE) y que sería más apropiado realizar un estudio dosis-respuesta ya que las diferencias entre razas podrían ocurrir al administrar otras dosis de Cu.

Además de las posibles diferencias en la capacidad de excreción biliar del Cu, la susceptibilidad de las diferentes razas al Cu, en una ingesta constante, puede estar relacionada con las diferencias en la absorción y el tamaño del hígado en relación con el peso corporal (Littledike et al., 1995). Hasta ahora no se pudo estudiar el efecto en la absorción; sin embargo, sí hay diferencias en el tamaño del hígado. En este estudio, el hígado de los terneros HF tenían un peso mayor (13,3 g/kg de peso corporal) que el de los de RG (11,9 g/kg de peso corporal) (Miranda et al., 2010). La raza HF tiene el objetivo productivo de aumentar el "rendimiento de leche" y, la síntesis de leche con proteínas, grasas y lactosa requiere una alta actividad hepática que se refleja en un mayor peso relativo del hígado en comparación con la raza RG y los cruces RGxHF, cuyo objetivo es la mejora muscular y la producción de carne. El tejido muscular (carne magra) tiene un contenido relativamente bajo de Cu, del orden de 0,361-1,29 mg/kg de peso fresco en el músculo semitendinoso (Miranda et al., 2010). De hecho, los terneros de raza HF presentan aproximadamente una quinta parte (16%) menos de músculo que los terneros RG (Miranda et al., 2010). Asumiendo un flujo regular de Cu hacia el tejido muscular, la mayor masa muscular de las razas cárnica podría explicar, al menos en parte, la menor concentración de Cu en el hígado en comparación con los terneros HF.

Al realizar una comparación a largo plazo de las "razas de leche y carne" debemos considerar las necesidades de Cu y otros oligoelementos para la síntesis de leche y músculo. En el caso de vacas lecheras de alta producción se debe evaluar la integración de la acumulación de oligoelementos en la síntesis de nutrientes lácteos. Esto significa que cualquier comparación empírica entre razas podría ser calificada por una aproximación factorial que estudie las necesidades de Cu para la síntesis de la leche y el tejido muscular.

5. CONCLUSIÓN

En condiciones de dietas con un alto contenido en Cu no se observaron diferencias entre razas en la capacidad para sintetizar MT a nivel hepático, para unir Cu a MT ni en la distribución de Cu dentro de los principales compartimentos subcelulares. A diferencia de las ovejas (y posiblemente de algunas razas bovinas), donde está claramente demostrado que la susceptibilidad a la acumulación de Cu depende de la capacidad genética de unir el Cu a las MT para que pueda ser excretado por la bilis, la mayor acumulación hepática de Cu en HF en comparación con RG puede estar relacionada con otros aspectos del metabolismo del Cu. Posiblemente la mayor acumulación hepática de Cu en terneros de raza HF es debida a una menor necesidad metabólica de Cu relacionada con su menor masa muscular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (España) (PGIDIT04RAG261005PR y 07MRU030261PR). Los autores dan las gracias a Lucía Casanova Iglesias y al personal de la RIAIDT de la USC por el apoyo técnico.

REFERENCIAS

- Bidewell CA, Drew JR, Payne JH, Sayers AR, Higgins RJ, Livesey CT. 2012. Case study of copper poisoning in a British dairy herd. *Veterinary Record*. 170: 464-469.
- Bremner I. 1991. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Methods Enzymology*. 205: 25-35.
- Bremner I. 1998. Manifestations of copper excess. *American Journal of Clinical Nutrition*. 67: 1069S-1073S.
- Bremner I, Beattie JH. 1990. Metallothionein and the trace minerals. *Annual Review of Nutrition*. 10: 63-83.
- Bremner I, Beattie JH. 1995. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proceedings of the Nutrition Society*. 54: 489-499.
- Commission Regulation, (EC) No 1334/2003/EC on amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements, *OJ L187* (2003) 11-15.
- Corbett WS, Saylor WW, Long TA, Leach RM. 1978. Intracellular distribution of hepatic copper in normal and copper-loaded sheep. *Journal of Animal Science*. 47: 1174-1179.

EFSA, 2012a. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Guidance for the preparation of dossiers for nutritional additives. EFSA Journal. 10(1): 2535. [14 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2535.

EFSA, 2012b. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Scientific Opinion on the safety and efficacy of copper compounds (E4) as feed additives for all animal species: cupric sulphate pentahydrate based on a dossier submitted by Manica S.p.A. EFSA Journal. 10(12): 2969. [38 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2969.

García-Vaquero M, López-Alonso M, Benedito JL, Hernández J, Gutiérrez B, Miranda M. 2011. Influence of Cu supplementation on toxic and essential trace element status in intensive reared beef cattle. Food Chemical and Toxicology. 49(12): 3358-3366.

Gooneratne SR, Howell J.McC, Gawthorne J. 1979. Intracellular distribution of copper in the liver of normal and copper loaded sheep. Research in Veterinary Science. 27: 30-37.

Gooneratne SR, Laarveld B, Chaplin RK, Christensen DA. 1989a. Profiles of ⁶⁷Cu in blood, bile, urine and faeces from ⁶⁷Cu-primed lamb: effect of ⁹⁹Mo-labelled tetrathiomolybdate on the metabolism of recently stored tissue ⁶⁷Cu. British Journal of Nutrition. 61: 355-371.

Gooneratne SR, Buckey WT, Christensen DA. 1989b. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. Canadian Journal of Animal Science. 69: 819-845.

Gooneratne SR, Symonds HW, Bailey JV, Christensen DA. 1994. Effects of dietary copper, molybdenum and sulphur on biliary copper and zinc excretion in Simmental and Angus cattle. Canadian Journal of Animal Science. 74: 315-325.

Henry RB, Liu J, Choudhuri S, Klaassen CD. 1994. Species variation in hepatic metallothionein. Toxicology Letters. 74 (1): 23-33.

Kumaratilake JS, Howell J.McC. 1989. Intracellular distribution of copper in the liver of copper-loaded sheep--a subcellular fractionation study. Journal of Comparative Pathology. 101 (2): 161-76.

Littledike ET, Wittum TE, Jenkins TG. 1995. Effect of breed, intake and carcass composition on the status of several macro and trace minerals of adult beef cattle. Journal of Animal Science. 73: 2113-2119.

López-Alonso M. 2008. Micronutrients and Health Research. Nova Science Publishers. Chapter VI, evaluation of chronic hepatic copper accumulation in cattle; pp. 207-226.

López-Alonso M. 2012. Trace Minerals and Livestock: Not Too Much Not Too Little. ISRN Vet Sci. Article ID 704825, 18 pages. doi:10.5402/2012/704825.

López-Alonso M, Prieto F, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL. 2005a. The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle. The Veterinary Journal. 169: 262-267.

López-Alonso M, Prieto F, Miranda M, Castillo C, Hernández J, Benedito JL. 2005b. Intracellular distribution of copper and zinc in the liver of copper-exposed cattle from northwest Spain. The Veterinary Journal. 170: 332-338.

Mehra RK, Bremner I. 1984. Species differences in the occurrence of copper-metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper-loaded animals. Biochemical Journal. 219(2): 539-546.

Miranda M, Cruz JM, López-Alonso M, Benedito JL. 2006. Variations in liver and blood copper concentrations in young beef cattle raised in north-west Spain: associations with breed, sex, age and season. *Animal Science*. 82(2): 253-258.

Miranda M, Gutiérrez B, Benedito JL, Blanco-Penedo I, García-Vaquero M, López-Alonso M. 2010a. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Archives of Animal Nutrition*. 64 (2): 98-110.

Miranda M, Benedito JL, Gutiérrez B, García-Vaquero M, Blanco-Penedo I, López-Alonso M. 2010. The interlobular distribution of copper in the liver of beef calves on a high-copper diet. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22: 277-281.

Nordberg M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*. 46: 243-254.

Puls, R. 1994. *Mineral Levels in Animal Health*, second ed., Diagnostic Data, Sherpa International, Clearbook, BC.

Saylor WW, Leach RM. 1980. Intracellular distribution of copper and zinc in sheep: effect of age and dietary levels of the metals. *Journal of Nutrition*. 110: 448-459.

Scheuhammer AM, Cherian MG. 1991. Quantification of metallothionein by silver saturation. *Methods of Enzymology*. 205: 78-83.

Suttle NF. 2010. *Mineral nutrition of livestock*. 4th edition. Cabi Publishing, Wallingford, UK.

Suzuki KT, Yamamoto K, Ogra Y, Kanno S, Aoki Y. 1994: Mechanisms for removal of copper from metallothionein by tetrathiomolybdate. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 54: 157-165.

Woolliams JA, Suttle NF, Wiener G, Field AC, Woolliams C. 1983. The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content. *The Journal of Agricultural Science*. 100: 441-449.



Conclusiones





4. CONCLUSIONES

1. La suplementación estándar de oligoelementos empleada en los sistemas de cría intensiva de terneros de cebo es la adecuada para la mayoría de razas criadas en el Norte de España, a pesar de que la suplementación con cobre puede ser excesiva haciendo que se acumulen altas cantidades de cobre en el hígado, sobre todo en terneros frisonos. La menor masa muscular de los terneros frisonos y su mayor capacidad metabólica para transportar estos elementos del hígado al músculo podrían explicar la mayor concentración de oligoelementos que aparece a nivel muscular en los frisonos. Dado que la carne es una fuente esencial de oligoelementos muy utilizada en la dieta humana, se necesitan nuevos estudios para esclarecer las diferencias raciales en las concentraciones de oligoelementos a nivel muscular.

2. Las diferencias entre razas observadas en las concentraciones de elementos traza en los músculos de nuestro estudio (limitadas al semitendinoso) están relacionadas principalmente con diferencias en su perfil oxidativo/glicolítico, si bien en el caso del cobre también contribuye la baja capacidad de exportar cobre del hígado hacia el músculo en las razas de aptitud de carne. Estas propiedades oxidativas/glicolíticas parecen estar relacionadas, al menos en parte, con el grado de hipertrofia de algunos músculos en razas muy musculadas (generalmente asociadas al fenómeno de doble musculatura). Se necesitan nuevos estudios que analicen en diferentes razas (aptitud de leche o carne o cruces industriales) los niveles de elementos traza en una amplia selección de cortes de la canal, dependiendo de su capacidad oxidativa/glicolítica, para ofrecer a los consumidores la carne que mejor se adapte a sus necesidades nutricionales.

3. En condiciones de dietas con un alto contenido en cobre no se observaron diferencias entre razas en la capacidad para sintetizar metalotioneínas a nivel hepático, para unir cobre a metalotioneínas, ni en la distribución de cobre dentro de los principales compartimentos subcelulares. A diferencia de las ovejas (y posiblemente de algunas razas bovinas), donde está claramente demostrado que la susceptibilidad a la acumulación de cobre depende de la capacidad genética de unir el cobre a las metalotioneínas para que pueda ser excretado por la bilis, la mayor acumulación hepática de cobre en terneros de raza Frisona en comparación con terneros de raza Rubia Gallega puede estar relacionada con otros aspectos del metabolismo del cobre. Posiblemente la mayor acumulación hepática de cobre en terneros de raza Frisona es debida a una menor necesidad metabólica de cobre relacionada con su menor masa muscular.



Anexos / Publicaciones





Biological Trace Element Research

Trace element concentrations in beef cattle related to the breed aptitude.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BTER-D-17-00534R2	
Full Title:	Trace element concentrations in beef cattle related to the breed aptitude.	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	Trace elements; breed; beef cattle; intensive systems; organs	
Corresponding Author:	V́ctor Pereira Universidade de Santiago de Compostela Lugo, SPAIN	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Santiago de Compostela	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	V́ctor Pereira	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	V́ctor Pereira Paloma Carbajales Marta Ĺpez-Alonso Marta Miranda	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia (PGIDIT04RAG261005PR)	Not applicable
	Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia (07MRU030261PR)	Not applicable
Abstract:	<p>Animal feed has traditionally been supplemented with trace elements at dietary concentrations well above physiological needs. However, environmental concerns have led to calls for better adjustment of mineral supplementation to actual physiological needs and, in this context, consideration of breed-related differences in trace element requirements. The aim of this study was to analyze trace element concentrations in the main breeds used for intensive beef production in northern Spain (Holstein-Friesian [HF], Galician-Blonde [GB] and GBxHF cross). Samples of blood, internal organs and muscle were obtained at slaughter from 10 HF, GB and GBxHF cross calves in the same feedlot. Overall, trace element concentrations in serum and internal organs were within adequate ranges and did not differ between breeds, suggesting that trace mineral supplementation was adequate in all groups. The only exception to this was copper, and hepatic copper concentrations were above adequate levels in all calves. This was particularly evident in the HF calves, and the maximum recommended level for human consumption was exceeded in 90% of these animals. Copper, iron, manganese, selenium and zinc concentrations in muscle were significantly higher in the HF than in the GB calves, with intermediate values for the crosses. These breed-related differences in trace element concentrations in the muscle may be related to lower muscle mass and/or higher hepatic activity in the HF (dairy) calves than in GB (beef) calves. As meat is an essential source of highly available trace elements in human diets, breed-related differences in trace element concentrations in meat deserve further investigation.</p>	

Trace element concentrations in beef cattle related to the breed aptitude

Victor Pereira^{1*}, Paloma Carbajales², Marta López-Alonso¹, Marta Miranda²

¹*Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain*

²*Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain*

*Corresponding author: e-mail: victor.pereira@usc.es, telephone number: (0034) 982822616

Running title: Trace element concentrations in beef cattle.

ORCID: Victor Pereira (0000-0002-1872-5726); Marta López-Alonso (0000-0001-6426-4273); Marta Miranda (0000-0002-9869-3874)

ABSTRACT

Animal feed has traditionally been supplemented with trace elements at dietary concentrations well above physiological needs. However, environmental concerns have led to calls for better adjustment of mineral supplementation to actual physiological needs and, in this context, consideration of breed-related differences in trace element requirements. The aim of this study was to analyze trace element concentrations in the main breeds used for intensive beef production in northern Spain (Holstein-Friesian [HF], Galician-Blonde [GB] and GBxHF cross). Samples of blood, internal organs and muscle were obtained at slaughter from 10 HF, GB and GBxHF cross calves in the same feedlot. Overall, trace element concentrations in serum and internal organs were within adequate ranges and did not differ between breeds, suggesting that trace mineral supplementation was adequate in all groups. The only exception to this was copper, and hepatic copper concentrations were above adequate levels in all calves. This was particularly evident in the HF calves, and the maximum recommended level for human consumption was exceeded in 90% of these animals. Copper, iron, manganese, selenium and zinc concentrations in muscle were significantly higher in the HF than in the GB calves, with intermediate values for the crosses. These breed-related differences in trace element concentrations in the muscle may be related to lower muscle mass and/or higher hepatic activity in the HF (dairy) calves than in GB (beef) calves. As meat is an essential source of highly available trace elements in human diets, breed-related differences in trace element concentrations in meat deserve further investigation.

Keywords: trace elements; breed; beef cattle; intensive systems; organs

INTRODUCTION

Trace minerals are required for the normal functioning of basically all biochemical processes in the body. They form part of numerous enzymes and coordinate many biological processes and are consequently essential for maintaining animal health and productivity [1].

Trace minerals must be provided to livestock at optimal concentrations according to requirements that vary during the rapid growth and development of the animals and the production cycle. However, considering individual variability in trace mineral contents of feedstuffs, as well as differences in bioavailability and interactions with other nutrients (mainly other trace elements), recommended supplementation [i.e. 2] includes a plus safety factor to ensure that the average gross demand of the population is met. In practice, this is feasible because, in most cases, dietary trace element concentrations can be formulated with large safety margins so that intake can generally exceed requirements without posing a risk to animal health [3]. Indeed, it is generally assumed that timely supplementation of complete trace minerals is an inexpensive insurance that is well worth the cost [4]. However, in recent years concern has arisen in the EU regarding adjustment of mineral supplementation to actual physiological needs, as large loads of trace elements (mainly Cu and Zn) are occurring in the environment as a consequence of animal supplementation above nutritional requirements [5, 6]. In order to adjust trace element supplementation more closely to nutritional needs, differences in breed requirements must be considered [7]. Ruminants, particularly sheep, display large interbreed differences in copper needs and copper tolerance [1], and episodes of copper deficiency or excessive hepatic accumulation can occur even when animals receive dietary copper concentrations within the limits outlined in the European legislation [8]. For example, the higher hepatic copper accumulation observed in the Holstein-Friesian (dairy) breed than in the Galician Blonde (beef) breed when reared intensively for beef production with standard trace element supplementation may be related to lower copper mobilization in the muscle in the dairy breed [9]. The European Food Safety Authority (EFSA) very recently recommended decreasing the maximum copper levels in complete feed for cattle from 35 to 30 mg kg⁻¹ [6].

The aim of the present study was to analyze trace element tissue concentrations in the main cattle breeds used for beef production in northern Spain (Holstein-Friesian [HF], Galician Blonde [GB] and their crosses [GBxHF]) when reared under intensive production with a standard mineral supplemented diet. We hypothesized that male HF calves used for beef production will require lower levels of trace element supplementation because of a lower muscle mass.

MATERIAL AND METHODS

Animals of study

Samples of blood, internal organs (liver, kidney, spleen, brain) and muscle were obtained at slaughter (at age 10 months) from HF, GB and GBxHF cross calves (ten of each) in the same feedlot. The animals were randomly selected from a larger lot (n=356) reared under identical conditions in a commercial feedlot in NW Spain. Once weaned, calves were fed with a typical beef cattle diet based on concentrate feed (and including a standard trace element supplementation) until slaughter. Details of the ingredients and nutritional composition of the diet are shown in Table 1. The calves were allowed free access to feed, water and barley straw. The mean daily barley straw intake was approximately 1 kg/animal. Performance parameters were recorded during the production process (Table 2).

Sample collection

Blood samples were collected (from the coccygeal vein) in heparin-free Vacutainer tubes prior to slaughter. Immediately after slaughter, samples of internal organs (liver, kidney (medulla and cortex), brain and spleen) and muscle (semitendinosus) were removed from each animal. The liver, kidney, spleen weights and carcass performance were recorded (Table 2). All samples were immediately refrigerated and transported to the laboratory. Within 6 h of collection, serum was obtained by centrifugation at 3,000 g for 15 min. Tissues were cleaned of connective tissue and fat. Triplicate subsamples of serum (2 mL) and tissues (ca. 10 g) were stored at -20°C pending analysis.

Sample analysis

The serum samples (2 mL) were processed by first adding 2.5 mL of 69% nitric acid for 1 h (cold digestion) and then adding 0.5 mL of hydrogen peroxide 33% w/v and placing the samples on a thermostatic block at 120°C for 60 min to complete the digestion. Two mL of Milli-Q ultrapure water was then added and, once cool, the digested samples were diluted to 10 mL with Milli-Q ultrapure water. Tissue samples (liver, kidney, brain, spleen and muscle) (ca. 2 g) were digested in 5 mL of 69% nitric acid and 2 mL 33% w/v hydrogen peroxide in a microwave digestion system (Milestone, Ethos Plus). Digested samples were transferred to polypropylene sample tubes and diluted to 25 mL with ultrapure water. The concentrations of essential trace elements (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; VGElemental PlasmaQuad SOption).

An analytical quality control programme was used during the study. Blank absorbance values were monitored throughout the analysis and subtracted from the readings for calculation of the final values. The limits of

detection (LoD) were calculated as three times the standard deviation of the reagent blanks (Table 3). The limits of quantification, expressed as concentration in the sample, were calculated on the basis of the mean sample weight and volume analyzed. The concentrations of the elements in serum and tissue samples were above the quantification limits. Analytical recoveries were determined from two certified reference materials analyzed together with the samples: Standard Reference Material® 1598a Bovine Serum and 1577c Bovine Liver (National Institute of Standards and Technology, USA). Good consistency between the measured and the certified values was observed (Table 3).

Statistical analyses

All statistical analyses were carried out with SPSS for Windows (vs 20.0). The Kolgomorov–Smirnov test was used to determine whether data were normally distributed. One-way ANOVA and post-hoc Tukey tests were used to evaluate the effect of breed (HF, GB and GB x HF) on performance parameters and trace element concentrations in blood and tissues. The influence of carcass performance and liver weight on trace element concentrations was evaluated by correlation analysis (Pearson’s coefficient). Differences in effects were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Data on breed performance in the calves under study are shown in Table 2. Daily intake and feed conversion were significantly higher in HF calves than in GB, while the values were intermediate in GBxHF crosses. When considering performance parameters at slaughter, carcass weight and carcass performance were significantly lower in HF calves than in GB calves, with GBxHF crosses again yielding intermediate values. Consequently, the internal organs were significantly heavier in HF calves than in GB and GBxHF crosses.

Serum trace element concentrations in calves in our study are shown in Table 4. Serum trace element concentrations were within the ranges considered adequate by Puls [10], Suttle [11] and Herdt and Hoff [12]. No statistically significant differences in element concentrations were observed between breeds, except for manganese, the concentrations of which were significantly higher in HF calves than in GB calves, again with intermediate values for the crosses. Zinc concentrations tended ($p = 0.09$) to be higher in HF calves than in the other breeds (GB and GB x HF crosses).

Trace element concentrations in internal organs in the calves under study are shown in Fig 1. Trace element concentrations in the liver (the main organ for trace element metabolism, and consequently the best indicator of trace element status) were adequate [10] and no statistically significant differences among breeds were found.

The only exception was copper: hepatic copper concentrations in all calves were above the adequate levels (25-100 mg kg⁻¹ fresh weight: [10]) and significantly higher in HF calves (189±38 mg kg⁻¹ fresh weight) than in GB calves (138±28 mg kg⁻¹). Moreover, 90, 70 and 40% of liver samples from respectively HF, GB x HF crosses and GB calves exceeded the maximum recommended level of copper for liver destined for human consumption (140 mg kg⁻¹ fresh weight), proposed by EFSA [13]. On the contrary, statistically significant breed-related differences in trace element concentrations were observed in the muscle for most elements (Fig 1): copper, iron, manganese, selenium and zinc concentrations were significantly higher in HF calves than in GB calves, and intermediate values were always obtained for the crosses. Finally, HF calves showed statistically significant lower molybdenum and selenium concentrations in the kidney and chromium and nickel in the brain than the GB calves or the crosses.

Correlations between trace elements concentrations in the muscle and carcass performance (as a gross indicator of muscle mass) and liver weight (as a gross indicator of metabolic capacity) are shown in Fig 2 and 3 respectively. Strong significant associations between copper, iron, manganese, selenium and zinc and carcass performance (negative) and liver weight (positive) were found.

DISCUSSION

The results of our study indicates that, with the exception of copper, trace element concentrations in serum and internal organs (being the liver the main indicator of trace mineral status) were adequate and no remarkable differences in terms of nutritional needs were observed among the main breeds used in beef production in our region. As previously indicated, the excessive hepatic copper accumulation in cattle under intensive production is a matter of current debate [6] and needs further attention to avoid risks for consumers and animals.

The pattern of trace element distribution found in our study, i.e. no breed-related differences in serum and most tissues (including liver) but higher concentrations in the muscle of HF calves, together with the significant associations with the carcass performance and liver weight, may be associated to anatomic and metabolic differences between dairy (HF) and beef (GB) aptitude breeds [14]. Interestingly, although trace element concentrations in the muscle were lower than in other tissues (1-2 orders of magnitude lower than in the main reservoir; Fig 1), the total concentrations of trace elements were higher in this tissue than in the rest of the body due to the large volume of muscle. The negative associations between carcass performance and trace element concentrations in the muscle may suggest a greater need for mobilization of minerals to the muscle in beef breeds [9]. Trace element concentrations in meat not only depend on the dietary intake but also on the metabolic

capacity of the animal to deliver trace elements from the liver to the muscle. It is possible that HF calves have a higher metabolic capacity to deliver trace elements into the muscle. In fact, dairy breeds are known to have a higher hepatic metabolic capacity than beef breeds [15, 16], which is related to the larger livers in the former [17].

Breed-related metabolic differences may also explain the statistically significant lower selenium and molybdenum concentrations in the kidneys and chromium and nickel in the brain of HF calves. Selenium and molybdenum, together with iodine, are renally excreted [11]: they are absorbed in excess in the intestine (proportionally to their concentration in the diet) and their homeostatic regulation mainly occurs in the kidney. This particular type of metabolism makes it feasible to increase the tissue concentrations of elements and has been taken advantage of in the industry to produce iodine- and selenium-enriched animal products [18, 19].

However, although breed-related differences in biliary excretion are well described in cattle for elements such as copper and zinc [20, 21], as far we are aware no information is available in relation to breed-related differences in renal excretion of elements. Information on chromium and nickel metabolism in cattle is scarce. Both elements are commonly associated in nature [22] and are used in many industrial and anthropogenic processes (i.e. to make dental alloys). Although chromium and nickel have long been considered toxic non-essential elements, recent data indicates that both are generally required in small amounts for normal animal growth and they are therefore now considered essential micronutrients [23, 24]. The role of chromium in glucose metabolism as part of the glucose tolerance factor is especially important (potentiating insulin action and improving glucose utilization, [25]), particularly in the brain, in which chromium alleviates cerebral oxidative stress in diabetes resulting from hyperglycemia [26]. Although it is difficult to discuss the the relevance of our findings in view of the lack of information about the metabolism of these elements, it is possible that the breed-related differences in chromium and nickel concentrations in the brain may be at least partly related to differences in glucose metabolism depending on the predominance of anabolic reactions (GB) or catabolic reactions (HF) in the different breeds.

CONCLUSIONS

The findings indicate that the standard trace element supplementation used in intensively reared beef-cattle is adequate for the main breeds reared in northern Spain, although copper supplementation may be excessive and lead to storage of copper in liver above the maximum recommended levels, particularly in HF calves. The

significantly higher trace element concentrations in muscle of HF (dairy aptitude) than in muscle of GB (beef aptitude) may be due to a lower muscle mass and/or a higher metabolic capacity to deliver trace elements from the liver to the muscle. As meat is an essential source of highly available trace elements in human diets, breed-related differences in trace element concentrations in meat deserve further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Lucia Casanova Iglesias and staff of RIAIDT for their technical assistance. This work was supported by the Xunta de Galicia (Spain) under grant PGIDIT04RAG261005PR and 07MRU030261PR. The English grammar of the text was revised by Christine Francis.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

All the experimental work was conducted in accordance with the European and Spanish legislation on the use of animals for research. All animal used was previously approved by the Bioethical Committee of the University of Santiago de Compostela and animals were enrolled with owner consent.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None of the authors have financial, personal or other relation-ships with other people or organizations within three years from the beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

REFERENCES

- [1] Suttle NF, Lewis RM, Small NW (2002) Effects of breed and family on rate of copper accretion in the liver of purebred Charollais, Suffolk and Texel lambs. *Anim. Sci.* 75, 295-302.
- [2] NRC (National Research Council) (2016) Nutrient requirements of beef cattle, eighth revised ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- [3] López-Alonso M, Miranda M (2012) Implications of excessive livestock mineral supplementation on environmental pollution and human health, in: De Leon DA, Aragon PR (Eds.), *Trace Elements: Environmental Sources, Geochemistry and Human Health*. Nova Science, pp. 40-53.

- [4] Petersen MK (1999) Considerations in trace mineral supplementation. Beef cattle handbook. BCH-5455. Product of Extension Beef Cattle Resource Committee, 2012, [http://www1.foragebeef.ca/\\$foragebeef/frgebeef.nsf/all/ccf1019/\\$FILE/tracemineralconsiderations.pdf](http://www1.foragebeef.ca/$foragebeef/frgebeef.nsf/all/ccf1019/$FILE/tracemineralconsiderations.pdf).
- [5] EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed) (2014) Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. EFSA Journal 2014;12(5), 3668-3677.
- [6] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2016) Revision of the currently authorised maximum copper content in complete feed. EFSA J. 14(8), 4563 [100 pp.]. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4563.
- [7] Pogge DJ, Richter EL, Drewnoski ME, Hansen SL (2012) Mineral concentrations of plasma and liver after injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle. J. Anim. Sci. 90, 2692-2698.
- [8] Commission Regulation (2003) (EC) No 1334/2003/EC on amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. Off. J. Eur. Union. L187, 11-15.
- [9] Miranda M, Gutiérrez B, Benedito JL, Blanco-Penedo I, García-Vaquero M, López-Alonso M (2010) Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. Arch. Anim. Nutr. 64 (2), 98-110.
- [10] Puls R (1994) Mineral Levels in Animal Health. Diagnostic Data, second ed. Sherpa International, Clearbook, BC.
- [11] Suttle NF (2010). Mineral nutrition of livestock, fourth ed. Cabi Publishing, Wallingford, UK.
- [12] Herdt TH, Hoff B (2011) The use of blood analysis to evaluate trace mineral status in ruminant livestock. Vet. Clin. Food. Anim. 27, 255-283.
- [13] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012) Scientific Opinion on the safety and efficacy of copper compounds (E4) as feed additives for all animal species: cupric sulphate pentahydrate based on a dossier submitted by Manica S.P.A. EFSA J. 10(12), 2969. [38 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2969.
- [14] Fiems LO (2012) Double muscling in cattle: genes, husbandry, carcasses and meat. Animals 2 (3), 472-506.
- [15] Baldwin RL, McLeod KR, Capuco AV (2004) Visceral tissue growth and proliferation during the bovine lactation cycle. J. Dairy Sci. 87, 2977-2986.

- [16] Bellmann O, Wegner J, Teuscher F, Schneider F, Voigt J, Derno M, Sauerwein H, Weingärtner J, Ender K (2004) Beef versus dairy cattle: a comparison of metabolically relevant hormones, enzymes and metabolites. *Livest. Prod. Sci.* 85, 41-54.
- [17] Taylor StCS, Murray JI (1991) Effect of feeding level, breed and milking potential on body tissues and organs of mature, non-lactating cows. *Anim. Prod.* 53, 27-38.
- [18] Schöne F, Leiterer M, Lebzien P, Bemann D, Spolders M, Flachowsky G (2009) Iodine concentration of milk in a dose-response study with dairy cows and implications for consumer iodine intake. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 23(2), 84-92.
- [19] Stockdale CR, Shields PM, McKenna A, Walker GP, Dunshea FR, Doyle PT (2011) Selenium levels in cows fed pasture and concentrates or a total mixed ration and supplemented with selenized yeast to produce milk with supra nutritional selenium concentrations. *J. Dairy Sci.* 94, 262-272.
- [20] Gooneratne SR, Symonds HW, Bailey JV, Christensen DA (1994) Effects of dietary copper, molybdenum and sulphur on biliary copper and zinc excretion in Simmental and Angus cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 315-325.
- [21] Gooneratne SR, Laarveld B, Pathirana KK, Christensen DA (2013) Biliary and plasma copper and zinc in pregnant Simmental and Angus cattle. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 80(1), 577 [7 pp.].
<http://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.577>.
- [22] Miranda M, Benedito JL, Blanco-Penedo I, López-Lamas C, Merino A, López-Alonso M (2009) Metal accumulation in cattle raised in a serpentine-soil area: relationship between metal concentrations in soil, forage and animal tissues. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 23 (3), 231-238.
- [23] Samal L, Mishra C (2011) Significance of nickel in livestock health and production. *Inter. J. Agro. Vet. Med. Sci.* 5(3), 349-361.
- [24] Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Ali S, Sahin N, Gencoglu H, Ozdan Y (2013) Chromium modulates expressions of neuronal plasticity markers and glial fibrillary acidic proteins in hypoglycemia-induced brain injury. *Life. Sci.* 93, 1039-1048. doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.009.
- [25] Vincent JB (2000) Quest for the molecular mechanism of chromium action and its relationship to diabetes. *Nutr. Rev.* 58, 67-72.

261 [26] Sahin K, Tuzcu M, Orhan C, Gencoglu H, Ulas M, Atalay M, Sahin N, Hayirli A, Komorowsk JR (2012)
1
2 262 The effects of chromium picolinate and chromium histidinate administration on NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathway
3
4 263 in the brain of diabetic rats. Biol. Trace. Elem. Res. 50, 291-296.
5
6 264



Figure legends

Fig 1. Trace element concentrations in internal organs (liver, kidney, spleen, brain) and muscle in Holstein Friesian (HF) (■), Galician Blonde (GB) (□) and GB x HF crosses (▤). For the same organ, different letters indicate statistically significant differences between breeds (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig 2. Scatter plot showing associations between carcass performance (%) and trace element concentrations in muscle samples from the calves under study (●) Holstein Friesian (HF), (○) Galician Blonde (GB), (◐) GB x HF crosses).

Fig 3. Scatter plot showing associations between liver weight (kg fresh weight) and trace element concentrations in muscle samples from the calves under study (●) Holstein Friesian (HF), (○) Galician Blonde (GB), (◐) GB x HF crosses).

Fig 1.

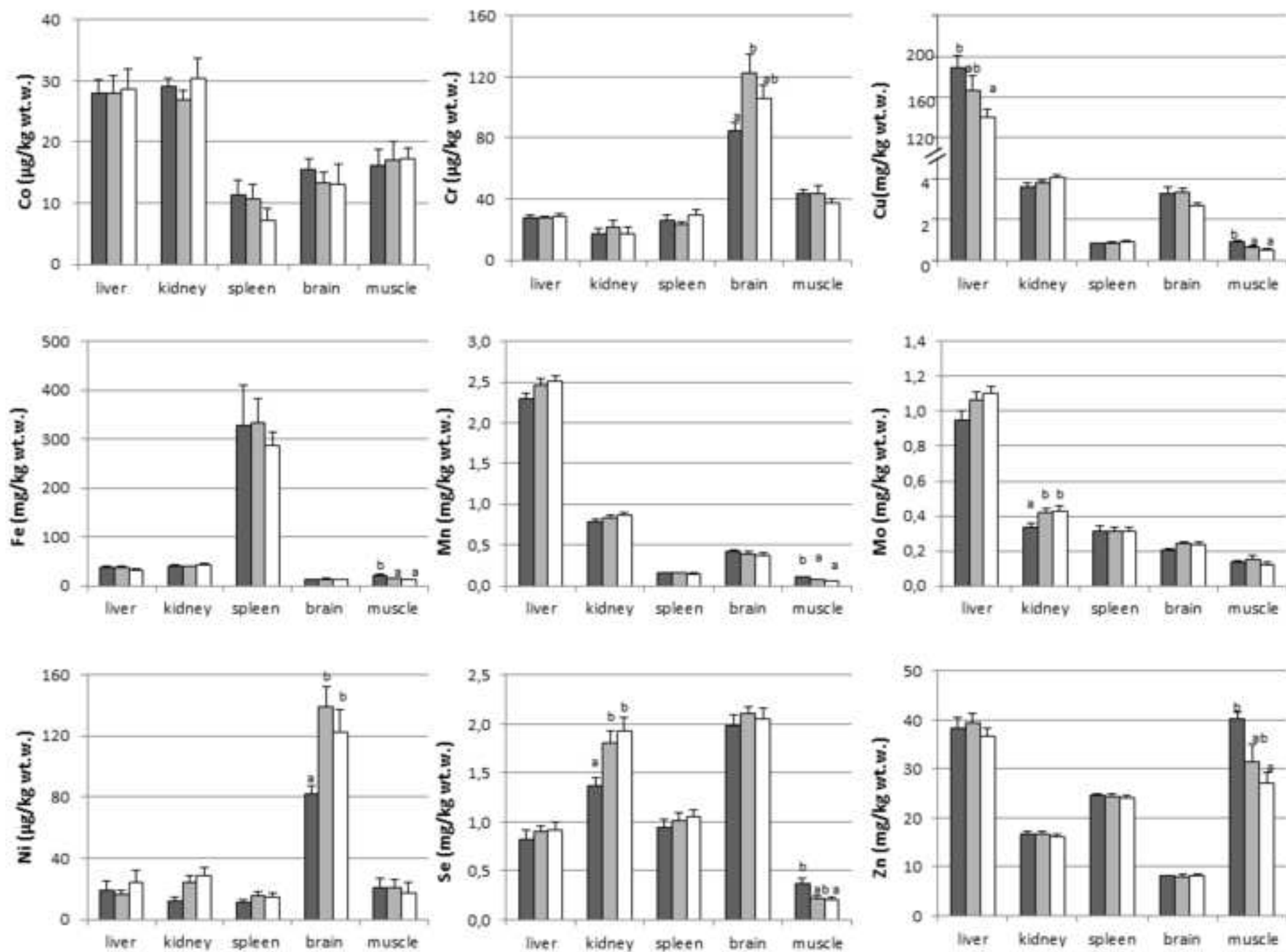


Fig 2.

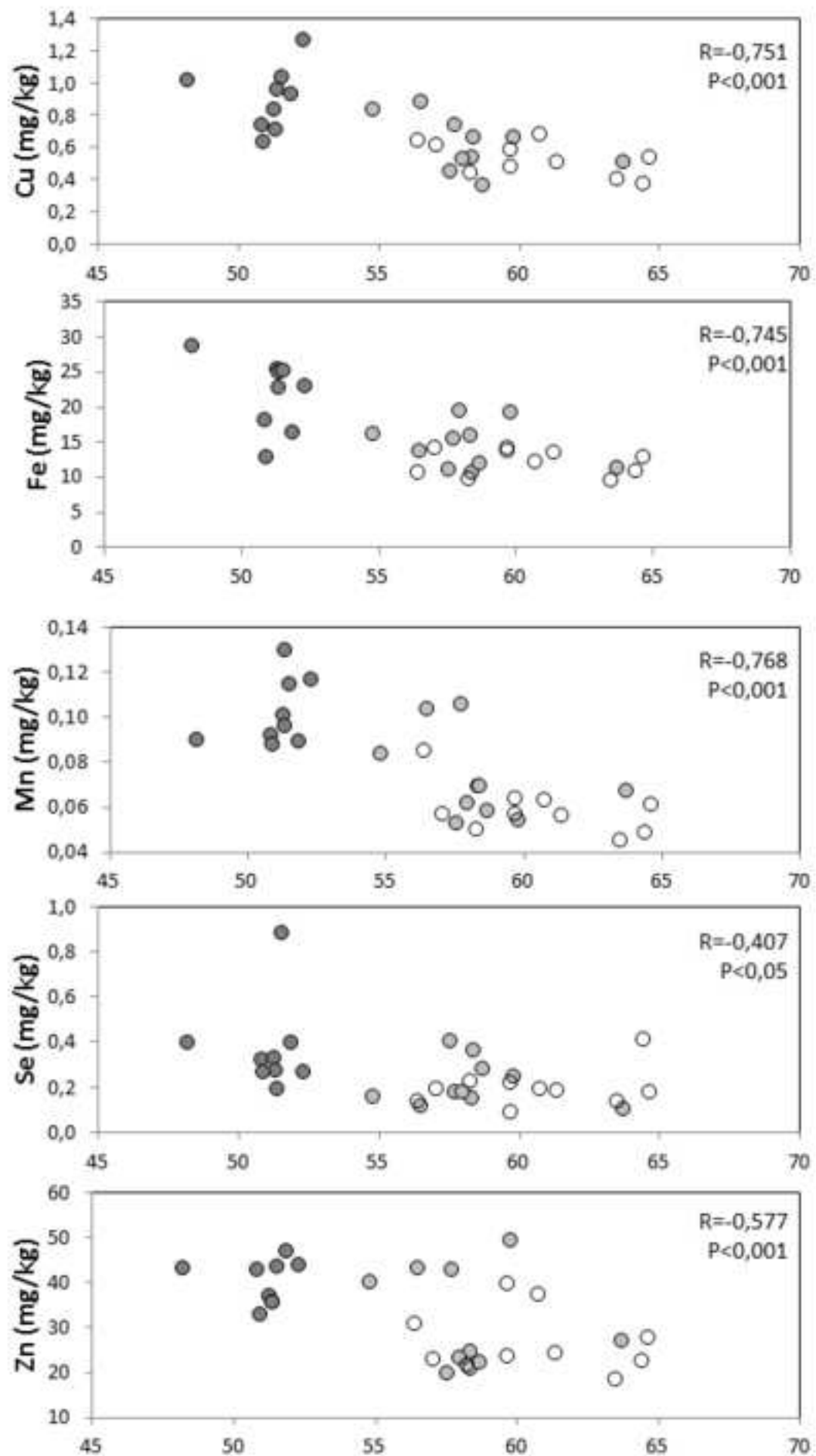


Fig 3.

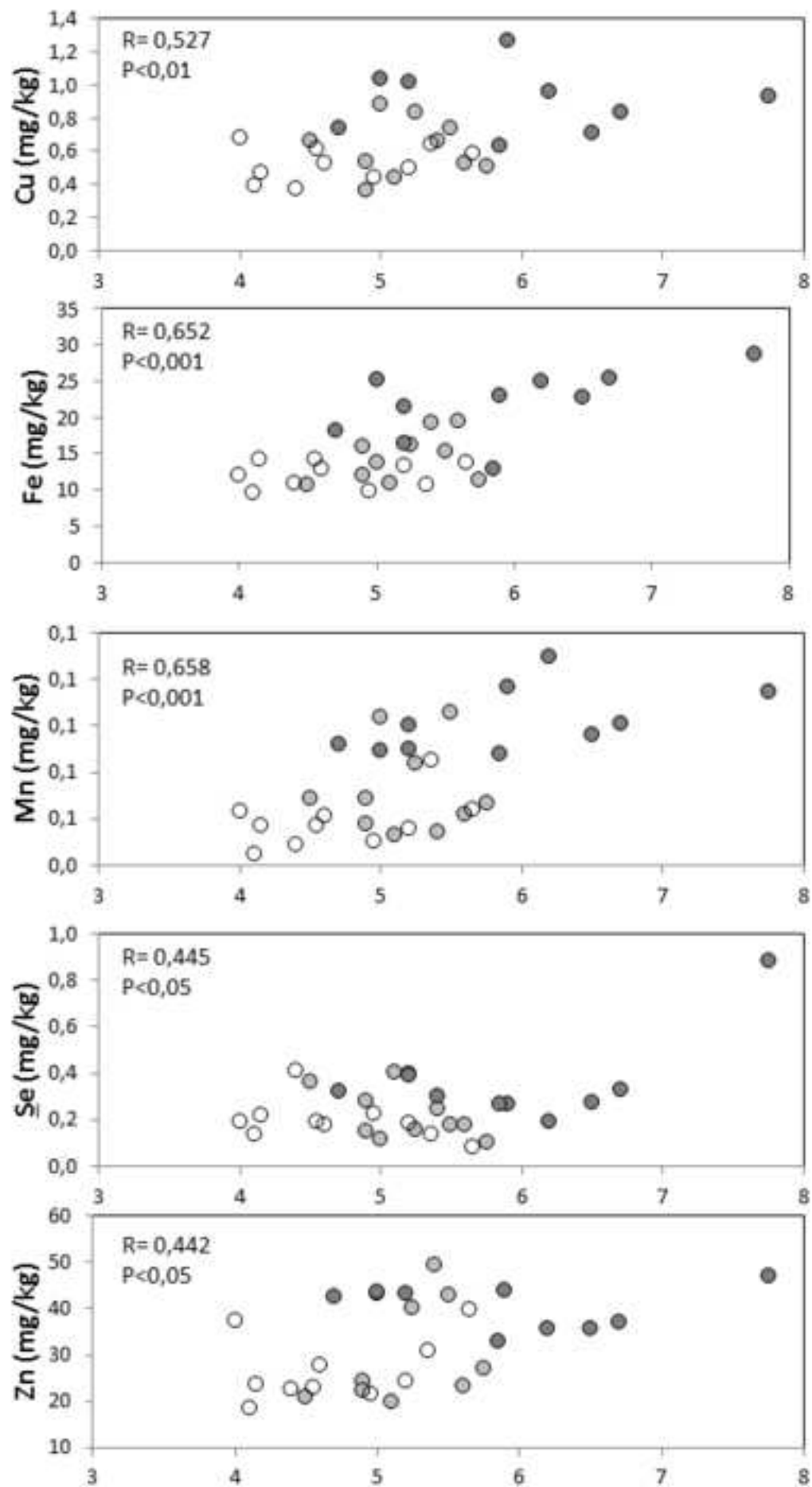


Table 1. Ingredients and chemical composition of the diets supplied in this study.

Ingredient (% DM)	
Corn	30
Barley	22.1
Soybean meal (44% CP)	16.7
Corn gluten feed	6.9
Wheat bran	8
Soybean hulls	10
Molasses	1
Palm oil	1.5
Vitamin/mineral premix*	3.2
Sodium bicarbonate	0.6
Chemical composition (% DM)	
Crude protein (CP)	15
Crude fibre (CF)	7.3
Neutral detergent fibre (NDF)	20.8
Acid detergent fibre (ADF)	11.1
Ether extract (EE)	3.5
Starch	31.1
Ash	5.8

* Vitamin and mineral premix containing (per kg DM premix): 10.000 IU vitamin A, 2000 IU vitamin D, 25 mg vitamin E, 0.3 mg Co, 16 mg Cu, 32 mg Fe, 0.5 mg I, 40 mg Mn, 0.1 mg Se and 32 mg of Zn.

Table 2. Zootechnical performance of animal by breed (means \pm SD)

	Holstein-		
	Friesian (HF)	GB x HF	Galician Blond (GB)
Initial live weight (kg)	129 \pm 21	133 \pm 19	143 \pm 28
Final live weight (kg)	401 \pm 40	399 \pm 31	402 \pm 29
Feed intake (kg/d)	8.77 ^a	8.06 ^{ab}	7.45 ^b
Average daily gain (ADG) (kg/d)	1.62	1.58	1.54
Feed conversion	5.41 ^a	5.10 ^{ab}	4.84 ^b
Carcass weight (kg)	202 \pm 21 ^a	231 \pm 22 ^{ab}	244 \pm 22 ^b
Carcass performance (%)	50.4 \pm 1.21 ^a	57.9 \pm 2.31 ^b	60.7 \pm 2.88 ^c
Liver weight (kg)	6.28 \pm 0.91 ^a	5.45 \pm 0.38 ^b	4.94 \pm 0.60 ^b
Kidney weight (kg)	0.571 \pm 0.044 ^a	0.488 \pm 0.039 ^b	0.417 \pm 0.051 ^c
Heart weight (kg)	1.68 \pm 0.24 ^a	1.56 \pm 0.14 ^b	1.51 \pm 0.17 ^b
Spleen weight (kg)	0.822 \pm 0.129	0.693 \pm 0.113	0.747 \pm 0.119

Different superscript letters indicates a significant difference between breeds (p<0.05).

Table 3. Limits of detection (LoD) ($\mu\text{g/L}$) and results of analysis of the certified reference materials: bovine liver SRM-1577 (mg/kg) and animal serum SRM-1598 ($\mu\text{g/L}$)

Element	LoD ($\mu\text{g/L}$)	Certified Reference Material			
		SRM 1577(mean \pm SD; mg/kg)		SRM 1598 (mean \pm SD; $\mu\text{g/L}$)	
		Certified	Analysed	Certified	Analysed
		levels	levels	levels*	levels
Co	0.2	0.300 \pm 0.018	0.311 \pm 0.011	1.24 \pm 0.07	1.09 \pm 0.08
Cr	0.1	0.053 \pm 0.014	0.051 \pm 0.011	(0.33 \pm 0.08)	0.34 \pm 0.07
Cu	2.3	275.2 \pm 4.6	272.9 \pm 12.2	1580 \pm 90	1524 \pm 70
Fe	6.1	197.94 \pm 0.65	196.07 \pm 2.69	1680 \pm 60	1696 \pm 80
Mn	1.1	10.46 \pm 0.47	10.49 \pm 0.23	1.78 \pm 0.33	1.80 \pm 0.27
Mo	1.4	3.30 \pm 0.13	3.32 \pm 0.13	(5.5 \pm 1.0)	5.4 \pm 0.9
Ni	0.4	0.0445 \pm 0.0092	0.0498 \pm 0.0104	0.94 \pm 0.18	0.98 \pm 0.13
Se	2.1	2.031 \pm 0.045	1.999 \pm 0.031	134.4 \pm 5.8	132.2 \pm 3.8
Zn	8.9	181.1 \pm 1.0	181.4 \pm 0.9	880 \pm 24	833 \pm 36

*In brackets reference and information values

Table 4. Trace element concentrations in serum in Holstein Friesian (HF), Galician Blonde (GB) and their crosses (GB x HF).

	HF		GB x HF		GB		P	Normal range (Puls, 1994)
	mean±SE	range	mean±SE	range	mean±SE	range		
Co (µg/l)	1.40±0.01	(1.35-1.44)	1.39±0.01	(1.35-1.45)	1.38±0.01	(1.30-1.45)		0.9-15
Cr (µg/l)	0.274±0.064	(0.239-0.300)	0.298±0.011	(0.249-0.353)	0.289±0.016	(0.187-0.369)		0.25-0.30
Cu(mg/l)	0.786±0.021	(0.703-0.873)	0.773±0.029	(0.616-0.912)	0.812±0.020	(0.713-0.908)		0.6-1.5
Fe (mg/l)	2.11±0.03	(1.93-2.27)	2.10±0.03	(1.98-2.25)	2.18±0.07	(1.93-2.59)		1.3-2.5
Mn (µg/l)	10.98±0.86 ^a	(8.75-17.83)	9.29±0.42 ^{ab}	(6.30-11.37)	7.44±0.72 ^b	(6.55-10.84)	**	6-70
Mo (µg/l)	50.4±3.4	(37.1-73.2)	54.5±3.3	(44.3-73.2)	54.3±2.72	(36.1-69.4)		10-100
Ni (µg/l)	3.21±0.09	(2.94-3.44)	3.19±0.07	(2.97-3.33)	3.22±0.02	(3.01-3.32)		1.2-5.6
Se (mg/l)	0.253±0.029	(0.130-0.425)	0.256±0.029	(0.145-0.456)	0.268±0.022	(0.181-0.408)		0.08-0.3
Zn (mg/l)	1.34±0.05	(0.93-1.48)	1.24±0.05	(1.05-1.51)	1.20±0.03	(0.98-1.32)		0.80-1.40

Different superscript letters indicates a significant difference between breeds (p<0.05). **

p<0.01



Manuscript Number:

Title: Importance of breed aptitude (beef or dairy) in determining trace element concentrations in bovine muscles

Article Type: Full Length Article

Keywords: trace elements; muscle; breed; beef; dairy

Corresponding Author: Dr. VICTOR PEREIRA,

Corresponding Author's Institution: Veterinary Faculty

First Author: MARTA MIRANDA

Order of Authors: MARTA MIRANDA; VICTOR PEREIRA; PALOMA CARBAJALES; MARTA LÓPEZ-ALONSO

Abstract: The aim of this study was to determine the concentrations of various trace elements in different muscles (oxidative-type, an intermediate oxidative/glycolytic-type and a glycolytic-type muscle) of ten dairy-aptitude breed (Holstein-Friesian, HF), ten beef-aptitude breed (Galician Blonde, GB) and ten cross-breed (GB x HF). The type of muscle was a highly significant factor in relation to the concentrations of all elements, whereas breed was only significant for Fe, Mn and Zn. Significant breed-related differences were only observed in the SM muscle. The concentrations of the main trace elements (Cu, Fe, Se and Zn) were statistically significantly lower in GB and GBxHF than in HF. The concentrations of these trace elements in the SM muscle were negatively associated with carcass performance. The pattern of distribution of these elements in the other types of muscles was similar in all three breeds, with significantly higher trace element concentrations in the CA muscle, followed by the DI muscle; trace element concentrations in the SM and TR muscles were very similar. The breed-related differences in trace element concentrations in SM muscle were mainly associated with differences in the oxidative/glycolytic profile, probably due to the muscular hypertrophy characteristic of heavily muscled breeds.

Suggested Reviewers: Antonio Humberto Minervino
Federal University of Western Pará, UFOPA
ah.minervino@gmail.com

Ravi Gooneratne
Faculty of Agriculture & Life Sciences. Lincoln University.
ravi.gooneratne@lincoln.ac.nz

Alena Pechova
Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and
Pharmaceutical Sciences, Palackého 1/3, Brno, Czech Republic
pechovaa@vfu.cz

Hugues Guyot

University of Liege. Faculty of Veterinary Medicine. Clinic for
Ruminants.
hugues.guyot@ulg.ac.be

Hanne Damgaard Poulsen
Institut for Husdyrvidenskab - Husdyrernæring og fysiologi Department of
Animal Science - Animal nutrition and physiology, Aarhus University
hdp@anis.au.dk

Opposed Reviewers:



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Importance of breed aptitude (beef or dairy) in determining trace element concentrations in bovine muscles

Marta Miranda¹, Victor Pereira^{2*}, Paloma Carbajales¹, Marta López-Alonso²

¹*Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain*

²*Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain*

*Corresponding author e-mail: victor.pereira@usc.es

Highlights

The concentrations of the main trace elements in meat were lower in beef-aptitude breeds.

Breed-related differences were only observed in the semimembranosus muscle.

Breed-related differences were mainly associated with the oxidative/glycolytic muscle profile.

Studying muscles from throughout the carcass will provide consumers meat that best fits with their nutritional requirements.

Abstract

The aim of this study was to determine the concentrations of various trace elements in different muscles (oxidative-type, an intermediate oxidative/glycolytic-type and a glycolytic-type muscle) of ten dairy-aptitude breed (Holstein-Friesian, HF), ten beef-aptitude breed (Galician Blonde, GB) and ten cross-breed (GB x HF). The type of muscle was a highly significant factor in relation to the concentrations of all elements, whereas breed was only significant for Fe, Mn and Zn. Significant breed-related differences were only observed in the SM muscle. The concentrations of the main trace elements (Cu, Fe, Se and Zn) were statistically significantly lower in GB and GBxHF than in HF. The concentrations of these trace elements in the SM muscle were negatively associated with carcass performance. The pattern of distribution of these elements in the other types of muscles was similar in all three breeds, with significantly

higher trace element concentrations in the CA muscle, followed by the DI muscle; trace element concentrations in the SM and TR muscles were very similar. The breed-related differences in trace element concentrations in SM muscle were mainly associated with differences in the oxidative/glycolytic profile, probably due to the muscular hypertrophy characteristic of heavily muscled breeds.

Keywords: trace elements, muscle, breed, beef, dairy

1. Introduction

Lean red meat plays an important role in healthy balanced diets because of the nutrients that it contains. In addition to being rich in proteins and low in carbohydrates, red meat contains essential trace elements in higher and more readily available concentrations than other foods. Red meat contains useful concentrations of the following important elements: iron (which helps prevent anaemia), zinc (important for immune system functioning and fertility) and selenium (which has antioxidant properties that help reduce the risk of heart disease and certain cancers) (Biesalski, 2005; Cabrera et al., 2010; Mateescu et al., 2014).

Trace element concentrations are not uniformly distributed across the carcass. Although red muscle is known to contain higher amounts of iron than other muscles (Macdougall et al., 1973; Bacou and Vigneron, 1988), recent studies have indicated that most trace element concentrations vary significantly across the carcass and that veal cuts including muscles with a high proportion of oxidative slow-twitch fibres (red muscles) contain higher levels of essential trace elements than veal cuts including glycolytic fast-twitch fibres (white muscles) (Czerwonka and Szterk 2015; López-Alonso et al., 2016; McGilchrist et al., 2016).

In addition, breed-related differences in trace element concentrations in meat are well documented in the literature (Cabrera et al., 2010; Pilarczyk, 2014; Duan et al., 2015; Domaradzki et al., 2016). Recent studies have indicated that trace mineral concentrations in muscle are at least partly genetically determined and heritable (Morris et al; 2013; Mateescu et al., 2014), that the genes involved may act via receptor, transporter and chaperone proteins (Morris et al; 2013) and, moreover, that trace element concentrations are associated with the main organoleptic properties (Duan et al., 2015).

1 In a recent study in intensively reared beef cattle, we found significantly higher trace element
2 concentrations in the muscles of a dairy-apititude breed (Holstein Friesian) than in the muscles
3 of a beef-apititude breed (Galician Blonde), with the cross-breed showing an intermediate
4 position (Pereira et al., unpublished results). Considering measurements of trace element
5 concentrations in blood and other organs, the most plausible explanation seems to be
6 differences in the capacity to deliver trace element to the muscles. This ability may be related to
7 significant differences in muscular mass (higher in beef-apititude breeds) and metabolic activity
8 (higher in dairy-apititude breeds). However, it is also possible that breed-related differences in
9 trace element concentrations in meat may be at least partly related to differences in the muscle
10 composition. Selection for enhanced muscling in animal production has been shown to increase
11 the proportion of the fast-twitch glycolytic type IIX myofibres in cattle (Wegner et al., 2000),
12 sheep (Greenwood et al., 2006) and pigs (Ruusunen and Puolanne, 2004).

13 As far we are aware, very few studies have evaluated trace element concentrations in different
14 types of muscles (depending on their oxidative or glycolytic capacity) in different breeds reared
15 under the same type of production system, in order to establish the degree to which breed-
16 related differences in muscle composition and/or trace element metabolism determine trace
17 element concentrations in meat cuts across the carcass. In a preliminary approach addressing
18 this question, we determined trace element concentrations in several muscles with different
19 oxidative/glycolytic profiles (diaphragm [DI], an oxidative-type muscle; trapezius [TR], an
20 intermediate oxidative/glycolytic type muscle; and semimembranosus [SM], a glycolytic-type
21 muscle) in a dairy-apititude breed (Holstein-Friesian, HF), a beef-apititude breed (Galician
22 Blonde, GB) and their crosses (GB x HF). We also included cardiac (CA) muscle in the study
23 because it contains high levels of trace elements and because of its particular structure (α -
24 cardiac slow fibres).

25 **2. Material and methods**

26 **2.1. Animals**

27 We selected 30 cows for the study: ten dairy-apititude HF; ten beef-apititude GB (the main beef-
28 aptitude breed in the region of the study with high presence in the national market) and ten GB
29

x HF cross-breed cows. The cows were selected at random from a larger group (n=214) reared in a commercial feedlot with the typical feed conditions used in Spain. The cows were fed a standard diet (including trace element supplementation) based on concentrate feed. Details of the ingredients and nutritional composition of the diet are shown in Table 1. The cows were allowed free access to feed, water and barley straw.

2.2. Sample collection

Four muscles were selected for study: cardiac (CA) and diaphragm (DI) muscle, because these muscles have a high oxidative capacity (based on their oxidative:glycolytic activity), trapezius (TR) muscle, as example of muscle with a predominance of fast-twitch fibres, and semimembranosus (SM) muscle, representative of muscle with a high predominance of slow-twitch fibers (Talmant et al., 1986).

Samples of muscles were collected from cows immediately after slaughter in a commercial abattoir. All samples were refrigerated immediately and transported to the laboratory. The muscle tissue was cleaned of connective tissue and fat. Triplicate subsamples (ca. 10 g) were stored at -20°C until analysis.

2.3. Zootechnical data

The carcass and liver weights were recorded, and carcass performance was calculated. The carcass weights (kg) were 204 ± 23 , 244 ± 21 and 231 ± 28 for HF, GB and GBxHF, respectively. The liver weights were 6.12 ± 0.92 , 4.68 ± 0.61 and 5.14 ± 0.54 for HF, GB and GBxHF, respectively. Carcass performance (%) values were 52.2 ± 1.21 , 62.4 ± 3.11 and 59.7 ± 2.33 for HF, GB and GBxHF, respectively.

2.4. Trace element analysis

Subsamples of approximately 1 g were digested in 5 mL of 69% nitric acid and 3 mL 33% w/v hydrogen peroxide in a microwave digestion system (Ethos Plus; Milestone, Sorisole, Italy). The digested samples were transferred to polypropylene sample tubes and diluted to 15 mL with ultrapure water. The concentrations of cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), molybdenum (Mo), nickel (Ni), selenium (Se) and zinc (Zn) were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS: VGElemental PlasmaQuad SOption).

An analytical quality control was applied throughout the study by analysis of blank samples at the same time as test samples. The values obtained for the blank samples were subtracted from the values obtained for the test samples before calculation of the final results. The limits of detection (LoD) were calculated as three times the standard deviation of the reagent blanks (Table 2). The limits of quantification were calculated on the basis of the mean sample weight. Analytical recoveries were determined from certified reference material (1577c Bovine Liver, National Institute of Standards & Technology, USA), which was analysed at the same time as the test samples. There was a good agreement between the measured and the certified values (Table 2).

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using SPSS for Windows (v. 20.0). The Kolmogorov-Smirnov test was used to test the assumption that the data were normally distributed. A general linear model (GLM) was used to test for the influence of breed and type of muscle on trace element concentration in muscles, with carcass performance and liver:carcass weight ratio as covariates. Post hoc DHS Tukey tests were used to detect any differences in trace element concentrations between breeds. The Pearson's correlation coefficient was used to test the correlation between trace element concentration in the different type of muscle (TR, SM, DI, CA) and carcass performance.

3. Results

The results of the GLM used to evaluate the effect of breed (HF, GB or GB x HF) and type of muscle (TR, SM, DI, CA) as main factors affecting trace element concentrations in muscles are presented in Table 3. The inclusion of the carcass performance (%) or the liver:carcass weight ratio in the analysis (as covariates) did not reveal any statistically significant influence on the trace element concentrations in muscles and did not improve the model fits (lower R^2 values were obtained in all cases); consequently, neither the carcass performance nor the liver:carcass weight ratio were included in the analysis. The only exceptions were Cu and Mo: carcass performance significantly affected the concentrations of Cu ($P=0.018$) and Mo ($P=0.005$) in muscles, and breed was also significant for Cu ($P=0.021$) and Mo ($P=0.007$).

Overall, the type of muscle was a highly significant factor in the analysis ($p>0.001$) for all elements, whereas breed was only significant for Fe, Mn and Zn. However, the significant interactions between breed and type of muscle for the main trace elements (Cu, Fe, Se and Zn) indicate that the concentrations of these elements in the different breed groups differ depending on the type of muscle considered.

The detailed analysis of the trace element concentrations revealed significant interactions between breed and type of muscle (Figure 1) and showed that the concentration of the main trace elements (Cu, Fe, Se and Zn) were very similar in all three groups of cattle ($p>0.05$), although the trace element concentrations in the SM muscle were significantly lower in GB and GBxHF than in HF. A similar pattern of trace element distribution in the other types of muscles was observed in all three groups, with significantly higher ($p<0.05$) trace element concentrations in the CA, followed by the DI muscle and very similar trace element concentrations in the SM and TR muscles. However, the concentrations of Zn were highest in the TR, followed by DI and SM and lowest in the CA.

Unlike the above-mentioned elements, there were no significant interactions between breed and type of muscle for Mn. The concentrations of Mn were highest in the CA muscle, followed by DI, and lowest in the SM and TR, with no difference between these muscles; in all cases the concentrations of Mn were lower in GB than in HF, with GBxHF showing an intermediate position, although differences were only statistically significant for SM and TR muscles.

Although there were statistically significant differences in the other elements present at very low concentrations (Co, Cr, Mo and Ni) across the muscles analysed (Table 3), no clear pattern of distribution was detected.

Examination of the correlations between different types of muscles and the carcass performance (Table 4) revealed highly significant correlations for most trace elements in the SM muscle.

4. Discussion

Nutritional metabolism differs greatly in beef and dairy breeds (Baldwin et al., 2004; Bellmann et al., 2004). In the present study, the HF cattle represents the catabolic or secretion type of

1 metabolism typical of dairy breeds, whereas the GB cattle represents the anabolic or accretion
2 type characteristic of the beef breeds (Pfuhl et al., 2007). In dairy breeds, the proportionally
3 larger internal organs enable ingestion of more feed and a hepatic function able to maintain a
4 high rate of milk production. From an endocrinological point of view, more frequent pulses with
5 lower amplitudes in the growth hormone, combined with lower plasma concentration of insulin
6 and IGF-1 results in a higher weight gain in beef cattle, with more muscle tissue in both
7 absolute and relative terms and less adipose tissue than in dairy cattle (Bellmann et al., 2004).
8

9
10 The known metabolic differences, together with the trace element distribution that we observed
11 in blood and internal organs in intensively reared cattle in a previous study (Pereira et al., 2017)
12 led us to hypothesize that the lower trace element concentrations in SM muscle in GB and
13 GBxHF than in HF were possibly related to a lower capacity of beef breeds to deliver trace
14 elements to the muscle. We obtained similar results in a detailed study of hepatic Cu
15 accumulation in these breeds (Miranda et al., 2010). However, the present findings show that
16 although trace element concentrations in muscle varied significantly in each of the three breeds,
17 significant differences between GB and HF were only found in the SM muscle. This finding
18 suggests that differences in trace element concentrations in the SM muscle are probably not
19 related to differences in the capacity to deliver trace elements from the liver to the muscle
20 (except for Cu and Mo), but may depend on other factors associated with this muscle. The
21 involvement of the SM muscle suggests that the differences may be related to the double-
22 muscling phenomenon characteristic of the GB breed.
23

24
25 The double-muscling phenomenon is characterized by mutations that inactivate the myostatin
26 gene, resulting in muscle hypertrophy (Charlier et al., 1995; Grobet et al., 1997; McPherron et
27 al., 1997). Double-muscled cattle are characterized by an excellent conformation and an
28 extremely high carcass yield, coinciding with smaller-sized internal organs (Vissac, 1968; Ansay
29 and Hanset, 1979). In double-muscled cattle, the number (and consequently the proportion) of
30 fast glycolytic fibres is much higher than in normal cattle. Due to the higher proportion of fast
31 glycolytic fibres, the muscles of double-muscled cattle have larger fibres than in normal cattle
32 (Olivan et al., 2004; Lefaucheur, 2010) and are characterized by a glycogen content, lower
33 levels of myoglobin and fat collagen, and a lower capillary density and number of mitochondria
34 (Fiems, 2012). The latter feature is largely responsible for the lower trace element
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 concentrations observed in the fast-glycolytic muscles (TR) in the present study, as also
2 suggested by Deveau and Cassar-Malek (2001) and Lefaucheur (2010).
3

4 Moreover, muscle hypertrophy is not uniform throughout the bodies of adult double-muscled
5 cattle. Comparisons between normal and double-muscled cattle made at a constant muscle
6 weight have shown that some regions are hypertrophied, isotrophied and even hypotrophied
7 (Boccard et al., 1974). The effects are related to the density of type I (oxidative), type IIA
8 (oxidative-glycolytic) and IIB (glycolytic) fibres in each muscle (Hwang et al., 2010; McGilchrist
9 et al., 2016). In particular, within the muscles analysed in the present study, differences
10 between breeds were only observed in the SM muscle (the more glycolytic muscle with a high
11 potential for hypertrophy in adult double-muscled cows) and no effects were observed in the TR
12 muscle (low hypertrophy potential) or DI muscle (which, together with masseter muscle, is more
13 oxidative, has a high proportion of type I fibres and is hypotrophied in double-muscled cattle)
14 (Boccard et al., 1974; Talmant et al., 1986). The CA muscle (type α -cardiac fibres) is also
15 affected in double-muscled cattle. The hearts of double-muscled cattle are 20% smaller than
16 those of normal cattle (Fiems, 2012). Picard et al. (1998) has demonstrated *in vitro* that in
17 bovine foetal myoblasts, the α -cardiac isoform was present in greater amounts in normal
18 fetuses at all stages and in all cell types than in the fetuses of double-muscled cows.
19 Moreover, Cassar-Malek et al. (2007) observed a marked down-regulation of genes encoding
20 slow contractile proteins such as type α -cardiac fibres or troponin C in muscles of late bovine
21 fetuses.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 As indicated, GB is the beef breed par excellence in the study region and is common throughout
42 Spain. It has a very high carcass yield (60%, with 55% extra and first categories) and the meat
43 has excellent organoleptic properties. Homozygosis of the myostatin gene, responsible for the
44 double-muscling character, is present in 55% of the tested population (more than 24000 cows,
45 MAGRAMA; 2016), particularly in males (84% relative to 44% in females; Moreno et al., 2009)
46 possibly due to the preferential selection by farmers of the more heavily muscled animals as
47 future sires. Since the development of artificial insemination in cattle, GB has become the most
48 commonly used breed for industrial crossings on dairy farms, which has contributed to the
49 increase in the double-muscling character of the dairy cattle population.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 The double-muscling phenomenon was not considered in the experimental design, and
2 therefore our findings cannot be fully interpreted in relation to this character. However, the
3 significant negative correlation between carcass performance (the productive endpoint most
4 affected by the character) and the main trace element concentrations only in the SM muscle -
5 one of the muscles most affected by the double-muscling phenomenon (Boccard et al., 1974)-
6 seems to indirectly support our hypothesis: the statistically significantly lower trace element
7 concentrations observed in the SM muscle of the GB and GBxHF cows may be related to a
8 higher proportion of type II (glycolytic) fibres in cattle with pronounced muscular hypertrophy.
9

10 A different situation was observed for Cu than for the other trace elements. The fact that breed
11 was only a significant factor when carcass performance was included in the analysis and that a
12 similar breed-related pattern (HF> GB x HF>GB, although not significant) was observed for Cu
13 concentrations in all skeletal muscles, seems to indicate that the lower capacity for delivery of
14 Cu from the liver to the muscle in beef-aptitude breeds may also contribute to explaining our
15 results, as in previous studies (Miranda, 2010). The same applies to Mo, although in this case
16 no breed-related differences were observed in the SM muscle. The significant effect of breed
17 when carcass performance was included in the analysis (as a covariable) may be related to the
18 significant interactions between Cu and Mo in ruminants (Suttle, 2010).
19

20 Information about the trace element concentrations in different beef cuts from different breeds of
21 cattle, considering their oxidative/glycolytic composition (as stated above, related to the double-
22 muscling phenomenon in highly muscled breeds), is very scarce. Most studies evaluating the
23 effect of breed on trace element composition in beef were conducted in a single muscle, the
24 *Longissimus dorsi*, which does not undergo hypertrophy in double-muscled cattle (Boccard et
25 al., 1974). Moreover, the findings of these studies are not conclusive. Studies of Hungarian
26 Grey and Holstein Friesian (Holló et al., 2007) and of steers resulting from crossing Angus with
27 Hereford, Angus, Brangus, Beefmaster, Bonsmara or Romosinuano sires (Duan et al., 2015))
28 did not observe any breed-related differences in trace element concentrations in the
29 *Longissimus dorsi* muscle. Pilarczyk (2014) reported significantly lower Cu, Zn, Mn and Fe
30 concentrations in meat from Charolais steers than in meat from Hereford and Simmental
31 steers. Similarly, Freitas et al. (2014) found differences in Fe and Zn concentrations in
32 *Longissimus dorsi* between Hereford, 1/4 Braford (1/4 Nelore, 3/4 Hereford) and 3/8 Braford
33

(3/8 Nelore, 5/8 Hereford) steers, with the pure Hereford steers generally showing lower concentrations (both when finished at pasture or in feedlot). A few studies have evaluated the effect of breed on several meat cuts across the carcass. For example, Cabrera et al. (2014) studied the Se, Cu, Zn, Fe, and Mn concentrations in seven meat cuts (tenderloin, eye of rump, strip loin, eye round, tri-tip, rib eye roll, and three-rib plate–flank on) from pasture-fed Hereford and Braford steers. Significant differences were observed across the carcass (with higher Cu and Zn and lower Fe contents in three-rib plate–flank than in most other meat cuts) but not between breeds or interactions between both factors. The present study findings are difficult to interpret in terms of muscle composition (oxidative/glycolytic) as cuts of meat (including different muscles) were evaluated. Very recently, Domaradzki et al. (2016) measured the concentrations of Fe, Cu, Zn and Mn in the *Longissimus lumborum* and *Semitendinosus* muscles of steers of five breeds: Polish Red, White-Backed, Polish Black-and-White, Simmental and Polish Holstein-Friesian. Significant differences in element concentrations (except for Mn) were found between muscles and breeds (but not interactions between both factors). The concentrations of Zn, Fe and Cu were statistically significantly higher in *Longissimus lumborum* than in *Semitendinosus* muscle (data for all breeds together). Regarding the different breeds (data given for both muscles together), the trace element concentrations were highest (except for Cu) in Polish Holstein-Friesian (dairy aptitude) cattle and lowest (except for Mn) in the Simmental (beef-aptitude, some possibly double-muscled) cattle. Finally, one simple study has considered the influence of the oxidative/glycolytic properties of different muscles across the carcass on the trace element composition (Czerwonka and Sterk, 2015). The study involved examination of 9 muscles of Holstein–Friesian bulls (*psoas major*, *longissimus dorsi*, *infraspinatus*, *triceps brachii*, *gluteus medius*, *rectus femoris*, *biceps femoris*, *gracilis* and *semimembranosus*). The concentrations of Zn and Fe ($p < 0.05$) were highest in *infraspinatus* (the most oxidative muscle of those analysed, according to Talmant et al., 1986) and lowest (although the difference was not statistically significant) in the *psoas major* (the most glycolytic together with *semimembranosus*). A study analysing trace element concentrations (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) in 12 types of muscles in Galician Blonde calves found that veal cuts including muscles with a high proportion of oxidative slow-twitch fibres (diaphragm and cardiac muscle)

1 contained significantly higher levels of essential trace elements, with lower concentrations found
2 in veal cuts including glycolytic fast-twitch fibres (eye round) (López-Alonso et al., 2016).
3
4
5
6

7 **5. Conclusion**

8
9 The study findings indicate that the breed-related differences in trace element concentrations in
10 muscle (limited to the SM) are mainly associated with differences in their oxidative/glycolytic
11 profile, although for Cu a limited delivery capacity from the liver to the muscle in beef-apitude
12 breeds was also important. The oxidative/glycolytic properties seem to be at least partly related
13 to the degree of hypertrophy of some muscles in muscular breeds (generally associated with
14 the double-muscling phenomenon). Further studies characterizing trace element concentrations
15 in a wide selection of muscles from throughout the carcass, selected in relation to their
16 oxidative/glycolytic capacity, in different breeds (dairy or beef cattle or industrial crosses) are
17 required with the final aim of providing meat that best fits the nutritional requirements of
18 consumers.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 **Acknowledgements**

33
34 This work was supported by the Xunta de Galicia (Spain) under grant PGIDIT04RAG261005PR
35 and 07MRU030261PR. The authors thank Lucia Casanova Iglesias and staff of RIAIDT for their
36 technical assistance. The English grammar of the text was revised by Christine Francis.
37
38
39
40
41
42

43 **Conflict of interest**

44 The authors declare that there are no conflicts of interest.
45
46
47
48

49 **References**

50
51 Albretch, E., Xu, J.X., Viergutz, T., Nürnberg, G., Zhao, R.Q., Wegner, J., 2009. Expression of
52 adipogenic genes in longissimus muscle and different adipose tissues of cattle representing
53 either the accretion or the secretion type, in: Chilliard, Y. et al. (Eds.), Ruminant Physiology:
54 Digestion, Metabolism and Effects of Nutrition on reproduction and welfare. pp. 458-460.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Ansary, M., Hanset, R., 1979. Anatomical, physiological and biochemical differences between conventional and double-muscled cattle in the Belgian Blue and White Breed. *Livest. Prod. Sci.* 6, 5-13. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(79\)90027-7](https://doi.org/10.1016/0301-6226(79)90027-7).
- Bacou, F., Vigneron, P., 1988. Propriétés des fibres musculaires squelettiques. 1. Influence de l'innervation motrice. *Reprod. Nutr. Dev.* 28 (6A), 1387-1453. <https://doi.org/10.1051/rnd:19880901>.
- Baldwin, R.L., McLeod, K.R., Capuco, A.V., 2004. Visceral tissue growth and proliferation during the bovine lactation cycle. *J. Dairy Sci.* 87, 2977-2986. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73429-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73429-3).
- Batjoens, P., Fiems, L.O., Van Hoof, J., Van Vooren, T., Vereecke, D., 1991. Myofibre composition and metabolic aspects in different strains of Belgian white-blue bulls and their relation to meat colour, in: *Proceedings of the 37th International Congress of Meat Science and Technology*, Kulmbach, Germany, pp. 324-327.
- Bellmann, O., Wegner, J., Teuscher, F., Schneider, F., Voigt, J., Derno, M., Sauerwein, H., Weingärtner, J., Ender, K., 2004. Beef versus dairy cattle: a comparison of metabolically relevant hormones, enzymes and metabolites. *Livest. Prod. Sci.* 85, 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2003.12.007>.
- Biesalski, H.K., 2005. Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Sci.* 70, 509-524. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.017>.
- Boccard, R., Dumont, B.L., Talmant, A., 1974. Conséquences de l'hypertrophie musculaire héréditaire des bovins sur la musculature. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 6(2), 177-186. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-6-2-177>.
- Cabrera, M.C., Ramos, A., Saadoun, A., Brito, G., 2010. Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. *Meat Sci.* 84, 518-528. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.007>.

Cassar-Malek, I., Passelaigue, F., Bernard, C., Léger, J., Hocquette, J.F., 2007. Target genes of myostatin loss-of-function in muscles of late bovine fetuses. BMC Genomics. 8, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-63>.

Charlier, C., Coppieters, W., Farnir, F., Grobet, L., Leroy, P.L., Michaux, C., Mni, M., Schwers, A., Vanmanshoven, P., Hanset, R., Georges, M., 1995. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. Mamm. Genome. 6, 788-792. <https://doi.org/10.1007/BF00539005>.

Czerwonka, M., Szterk, A., 2015. The effect of meat cuts and thermal processing on selected mineral concentration in beef from Holstein–Friesian bulls. Meat Sci. 105, 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.011>.

De Freitas, A.K., Lobato, J.F., Cardoso, L.L., Tarouco, J.U., Vieira, R.M., Dillenburg, D.R., Castro, I., 2014. Nutritional composition of the meat of Hereford and Braford steers finished on pastures or in a feedlot in southern Brazil. Meat Sci. 96(1), 353-360. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.07.021>.

Deveaux, V., Cassar-Malek, I., Picard, P., 2001. Comparison of contractile characteristics of muscle from Holstein and Double-Muscling Belgian Blue fetuses. Comp Biochem. Physiol. 131, 21-29. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00459-7](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00459-7).

Domaradzki, P., Florek, M., Staszowska, A., Litwińczuk, Z., 2016. Evaluation of the Mineral Concentration in Beef from Polish Native Cattle. Biol. Trace Elem. Res. 171 (2), 328-332. <http://doi.org/10.1007/s12011-015-0549-3>.

Duan, Q., Tait Jr, R.G., Schneider, M.J., Beitz, D.C., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Cundiff, L.V., Reecy, J.M., 2015. Sire breed effect on beef longissimus mineral concentrations and their relationships with carcass and palatability traits. Meat Sci. 106, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.020>.

Dumont, B.L., 1982. Carcass composition and muscle structure in hypertrophied animals, in: King, J.W.B., Menissier, F. (Eds.), Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production. Martinus Nijhoff Publishers: The Hague, The Netherlands, pp. 111-133. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-009-7550-7_8.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fiems, L.O., 2012. Double muscling in cattle: Genes, Husbandry, carcasses and meat. *Animals*. 2, 472-506. <http://doi.org/10.3390/ani2030472>.

Gagnière, H., Picard, B., Jurie, C., Geay, Y., 1997. Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-muscled cattle. *Meat Sci.* 45, 145-152. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00107-6).

Gagnière, H., Ménéssier, F., Geay, Y., Picard, B., 2000. Influence of genotype on contractile protein differentiation in different bovine muscles during foetal life. *Ann. Zootech.* 49, 405-423. <https://doi.org/10.1051/animres:2000132>.

Gil, M., Serra, X., Gispert, M., Angels Oliver, M., Sanudo, C., Panea, B., Olleta, J.L., Campo, M., Olivan, M., Osoro, K., Garcia-Cachan, M.D., Cruz-Sagredo, R., Izquierdo, M., Espejo, M., Martin, M., Piedrafita, J., 2001. The effect of breed-production systems on the myosin heavy chain 1, the biochemical characteristics and the colour variables of Longissimus thoracis from seven Spanish beef cattle breeds. *Meat Sci.* 58(2), 181-188. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00150-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00150-9).

Girgenrath, S., Song, K., Whittemore, L.A., 2005. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 31, 34-40. <http://doi.org/10.1002/mus.20175>.

Greenwood, P.L., Gardner, G.E., Hegarty, R.S., 2006. Lamb myofibre characteristics are influenced by sire estimated breeding values and pastoral nutritional system. *Aust. J. Agric. Res.* 57, 627-639. <https://doi.org/10.1071/AR04318>.

Grobet, L., Royo Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R., Georges, M.A., 1997. A deletion in the myostatin gene causes double muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17, 71-74. <http://doi.org/10.1038/ng0997-71>.

Holló, G., Nuernberg, K., Holló, I., Csapó, J., Seregi, J., Repa, I., Ender, K., 2007 Effect of feeding on the composition of longissimus muscle of Hungarian Grey and Holstein Friesian bulls. III Amino acid composition and mineral content. *Arch. Tierz. Dummerstorf.* 50(6), 575-586. <http://archtierz.fbn-dummerstorf.de/pdf/2007/at07p575.pdf>.

1 Lefaucheur, L., 2010. A second look into fibre typing - Relation to meat quality. Meat Sci. 84 (2),
2 257-270. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.004>.
3
4 Hwang, Y.H., Kim, G.D., Jeong, J.Y., Hur, S.J., Joo, S.T., 2010. The relationship between
5 muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native
6 cattle) steers. Meat Sci. 86, 456-461. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.034>.
7
8
9
10
11 Kühn, C., Bellmann, O., Voigt, J., Wegner, J., Guiard, V., Ender, K., 2002. An experimental
12 approach for studying the genetic and physiological background of nutrient transformation in
13 cattle with respect to nutrient secretion and accretion type. Arch. Tierz. 45, 317-330.
14
15 <http://archtierz.fbn-dummerstorf.de/pdf/2002/at02p317.pdf>.
16
17
18
19 López-Alonso, M., Miranda, M., Benedito, J.L., Pereira, V., García-Vaquero, M., 2016. Essential
20 and toxic trace element concentrations in different commercial veal cuts in Spain. Meat Sci.
21 121, 47-52. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.05.013>.
22
23
24
25
26 Macdougall, D.B., Bremner, I., Dalgarno, A.C., 1973. Effect of dietary iron on the colour and
27 pigment concentration of veal. J. Sci. Food Agric. 24(10), 1255-1263.
28
29 <http://doi.org/10.1002/jsfa.2740241015>.
30
31
32
33 MAGARAMA, 2016. [http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/bovino/rubia-gallega/usos_sistema.aspx)
34 [ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/bovino/rubia-gallega/usos_sistema.aspx](http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/autoctona-fomento/bovino/rubia-gallega/usos_sistema.aspx).
35
36
37 Mateescu, R.G., Garmyn, A.J., Tait, R.G., Duan, Q., Liu, Q., Mayes, M.S., Garrick, D.J., van
38 Eenennaam, A.L., VanOverbeke, D.L., Hilton, G.G., Beitz, D.C., Reecy, J.M., 2013. Genetic
39 parameters for concentrations of minerals in longissimus muscle and their associations with
40 palatability traits in Angus cattle. J. Anim. Sci. 91, 1067-1075. [https://doi.org/10.2527/jas.2012-](https://doi.org/10.2527/jas.2012-5744)
41 [5744](https://doi.org/10.2527/jas.2012-5744).
42
43
44
45
46
47
48 McGilchrist, P., Greenwood, P.L., Pethick, D.W., Gardner, G.E., 2016. Selection for increased
49 muscling in Angus cattle did not increase the glycolytic potential or negatively impact pH
50 decline, retail colour stability or mineral content. Meat Sci. 114, 8–17.
51
52 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.007>.
53
54
55
56
57 McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by
58 a new TGF- β superfamily member. Nature. 387, 83-90. <http://doi.org/10.1038/387083a0>.
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Miranda, M., Gutiérrez, B., Benedito, J.L., Blanco-Penedo, I., García-Vaquero, M., López-Alonso, M., 2010. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Arch. Anim. Nutr.* 64 (2), 98-110. <http://dx.doi.org/10.1080/17450390903461576>.

Moreno, A., Viana, J.L., Sánchez, L., Iglesias, A., 2009. Relationship with the double-muscled phenotype in “Rubia Gallega” cattle breed. Book of abstracts of the 60th annual meeting of the European Association for Animal Production. http://old.eaap.org/Previous_Annual_Meetings/2009Barcelona/Papers/01_Moreno2.pdf.

Morris, C.A., Bottema, C.D., Cullen, N.G., Hickey, S.M., Knowles, S.O., Pitchford, W.S., 2013. Effects of quantitative trait loci and the myostatin locus on trace and macro elements (minerals) in bovine liver, muscle and kidney. *Anim Genet.* 44, 361-368. <https://doi.org/10.1111/age.12012>.

Oliván, M., Martínez, A., Osoro, K., Sañudo, C., Panea, P., Olleta, J.L., Campo, M.M., Oliver, M.A., Serra, X., Gil, M., Piedrafita, J., 2004. Effect of muscular hypertrophy on physicochemical, biochemical and texture traits of meat from yearling bulls. *Meat Sci.* 68, 567-575. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.05.008>.

Pfuhl, R., Bellmann, O., Kühn, C., Teuscher, F., Ender, K., Wegner, J., 2007. Beef versus dairy cattle: a comparison of feed conversion, carcass composition, and meat quality. *Arch. Tierz.* 50, 59-70. <http://archtierz.fbn-dummerstorf.de/pdf/2007/at07p059.pdf>.

Pereira, V., Carbajales, P., López-Alonso, M., Miranda, M., 2017. Effect of breed (dairy or beef) on trace element concentrations in cattle reared intensively for meat production. Unpublished results.

Picard, B., Cassar-Malek, I., 2009. Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Sci.* 82, 30-36. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.11.022>.

Picard, B., Depreux, F., Geay, Y., 1998. Muscle differentiation of normal and double-muscled bovine foetal myoblasts in primary culture. *Basic. Appl. Myol.* 8, 197-203. <https://pdfs.semanticscholar.org/195a/5dbae0f9432d8098d96a5bcf4f0e511f33f9.pdf>.

- Pilarczyk, R., 2014. Concentrations of toxic and nutritional essential elements in meat from different beef breeds reared under intensive production systems. *Biol. Trace Elem. Res.* 158, 36-44. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9913-y>.
- Ruusunen, M., Puolanne, E., 2005. Reducing sodium intake from meat products. *Meat Sci.* 70, 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.016>.
- Suttle, N.F., 2010. Mineral nutrition of livestock, fourth ed. Cabi Publishing, Wallingford, UK. <http://doi.org/10.1079/9780851991283.0000>.
- Schönfeldt, H.C., Naudé, R.T., Boshoff, E., 2010. Effect of age and cut on the nutritional content of South African beef. *Meat Sci.* 86, 674–683. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.004>.
- Somogyi, T., Holló, I., Csapó, J., Anton, I., Holló, G., 2015. Mineral content of three several muscles from six cattle genotypes. *Acta Aliment.* 44(1), 51-59. <https://doi.org/10.1556/AAlim.44.2015.1.4>.
- Talmant, A., Monin, G., Briand, M., Dadet, M., Briand, Y., 1986. Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscles. *Meat Sci.* 18(1), 23-40. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(86\)90064-1](https://doi.org/10.1016/0309-1740(86)90064-1).
- Uytterhaegen, L., Claeys, E., Demeyer, D., Lippens, M., Fiems, L.O., Boucqué, C.V., Van de Voorde, G., Bastiaens, A., 1994. Effects of double-muscling on carcass quality, beef tenderness and myofibrillar protein degradation in Belgian Blue White bulls. *Meat Sci.* 38, 255-267. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90115-5).
- Vissac, B., 1968. Étude du caractère culard. II. Incidence du caractère culard sur la morphologie générale des bovins. *Ann. Zootech.* 17, 77-101. <https://doi.org/10.1051/animres:19680107>.
- Wegner, J., Albrecht, E., Fiedler, I., Teuscher, F., Papstein, H.J., Ender, K., 2000. Growth- and breed related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *J. Anim. Sci.* 78, 1485-1496. <http://doi.org/10.2527/2000.7861485x>.

Table 1. Chemical composition and ingredients of the concentrate fed in this study.

Chemical composition (% DM)	
Crude protein (CP)	15.5
Crude fibre (CF)	5.6
Neutral detergent fibre (NDF)	21.6
Acid detergent fibre (ADF)	7.2
Ether extract (EE)	4.7
Ash	5.1
Ingredient (% DM)	
Corn	29
Barley	19.5
Soybean meal (44% CP)	13.9
Corn gluten feed	12.4
Wheat bran	8.4
Soybean hulls	7.5
Molasses	3.5
Palm oil	2
Vitamin/mineral premix*	3.2
Sodium bicarbonate	0.6

* 1 kg of premix contains: 10.000 IU vitamin A, 2000 IU vitamin D, 10 mg vitamin E, 0.3 mg Co, 16 mg Cu, 10 mg Fe, 1.8 mg I, 110 mg Mn, 0.3 mg Se and 120 mg of Zn.

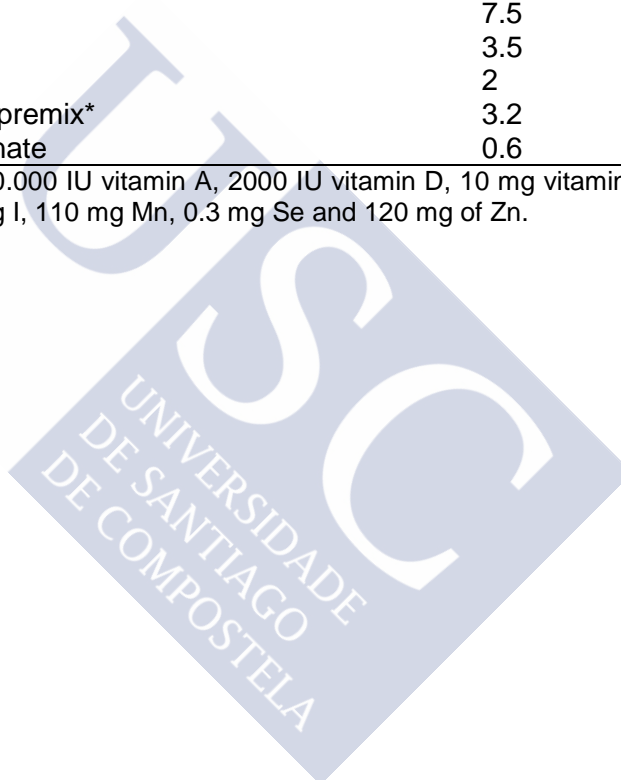


Table 2. Analytical quality program expressed as mean±standard deviation used in the determination of trace elements

	SRM 1577c		
	Detection limit (µg/L)	Analysed levels (mg/Kg)	Certified levels (mg/Kg)
Co	0.1	0.307±0.014	0.300±0.018
Cr	0.2	0.050±0.016	0.053±0.014
Cu	4.3	274.1±13.7	275.2±4.6
Fe	11	198.01±1.94	197.94±0.65
Mn	2.1	10.11±0.18	10.46±0.47
Mo	1.3	3.27±0.11	3.30±0.13
Ni	0.3	0.0477±0.0111	0.0445±0.0092
Se	1.6	2.051±0.029	2.031±0.045
Zn	11	180.1±0.7	181.1±1.0



Table 3. Summary of the general linear model analysis of trace element concentrations in muscle, with breed and muscle type as main factors. Statistical significance was indicated by ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

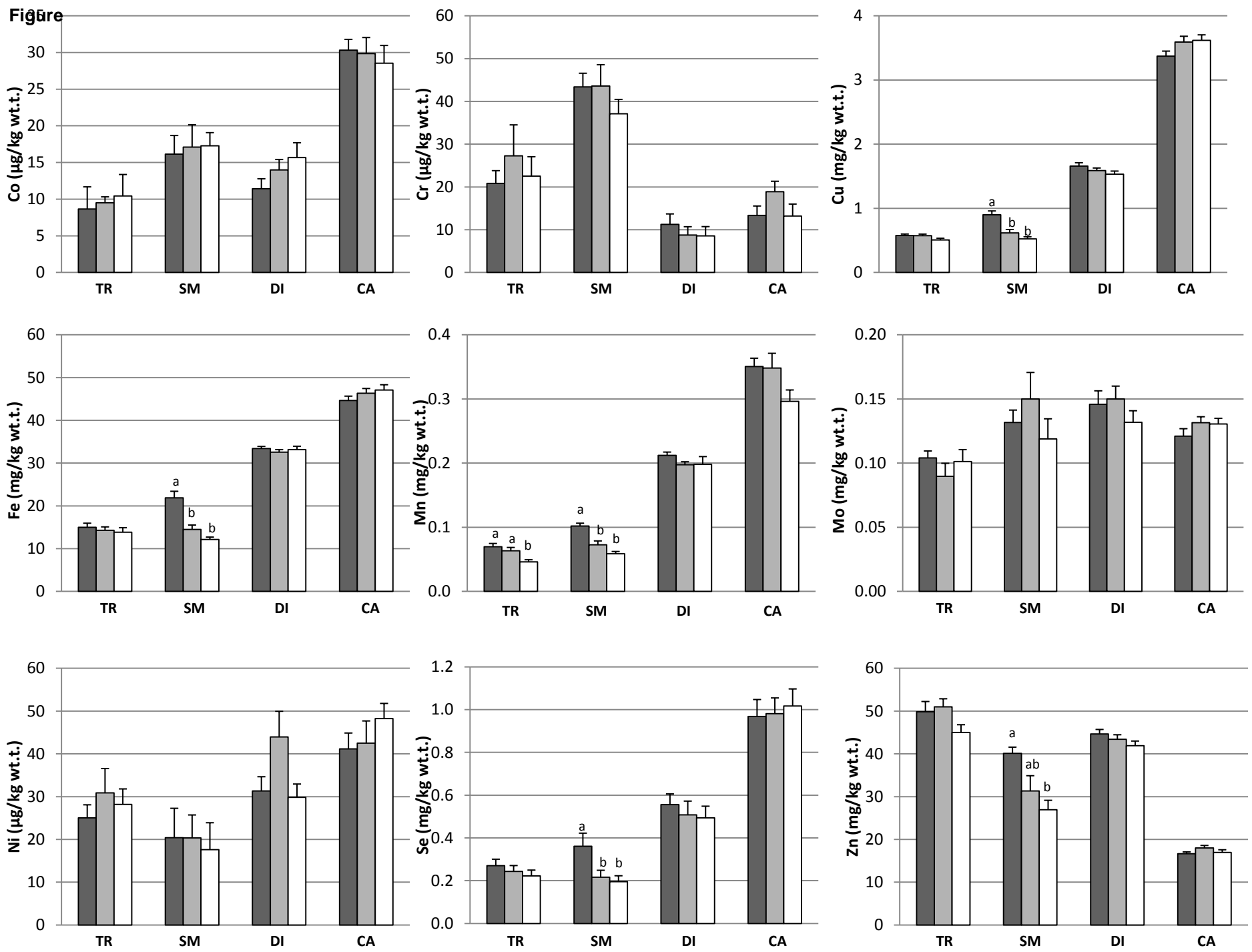
	breed	muscle	breed*muscle	R ²
Co	F _{2,119} = 0.811	F _{3,119} = 46.605 ***	F _{6,119} = 0.146	0.569
Cr	F _{2,119} = 0.507	F _{3,119} = 22.399 ***	F _{6,119} = 0.672	0.401
Cu	F _{2,119} = 0.761	F _{3,119} = 1773.665 ***	F _{6,119} = 3.617 **	0.979
Fe	F _{2,119} = 7.948 ***	F _{3,119} = 704.301 ***	F _{6,119} = 6.634 ***	0.953
Mn	F _{2,119} = 6.959 ***	F _{3,119} = 153.578 ***	F _{6,119} = 0.551	0.816
Mo	F _{2,119} = 1.115	F _{3,119} = 100.774 ***	F _{6,119} = 0.870	0.741
Ni	F _{2,119} = 1.070	F _{3,119} = 13.899 ***	F _{6,119} = 0.756	0.309
Se	F _{2,119} = 0.104	F _{3,119} = 33.947 ***	F _{6,119} = 3.830 **	0.487
Zn	F _{2,119} = 10.025 ***	F _{3,119} = 187.029 ***	F _{6,119} = 3.038 **	0.849

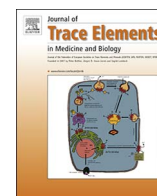


Table 4. Pearson's correlations between trace element concentration in the different type of muscles (TR: trapezius; SM: semimembranosus; DI: diaphragm; CA: cardiac) and the carcass performance. Statistical significance of the correlations was indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

	TR	SM	DI	CA
Co	0.171	-0.002	0.273	0.022
Cr	-0.034	-0.064	-0.172	0.068
Cu	-0.376*	-0.753***	-0.263	0.012
Fe	-0.242	-0.745***	-0.057	0.004
Mn	-0.493**	-0.769***	-0.144	-0.227
Mo	0.096	0.122	0.016	-0.227
Ni	0.251	0.061	0.183	0.072
Se	-0.071	-0.423*	-0.045	0.190
Zn	-0.311	-0.579***	-0.096	-0.061



Figure



Veterinary medicine

Subcellular distribution of hepatic copper in beef cattle receiving high copper supplementation

Marta López-Alonso^a, Paloma Carbajales^b, Marta Miranda^{b,*}, Victor Pereira^a^a Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain^b Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Copper accumulation
Liver
Metallothionein
Subcellular distribution
Cattle breed
Zinc

ABSTRACT

Previous studies of intensively reared cattle in NW Spain have reported significantly higher copper (Cu) accumulation in the liver in Holstein-Friesian (HF) animals than in Galician Blonde (GB) or GBxHF crosses when receiving a diet supplemented at the maximum Cu concentrations allowed in the EU legislation (35 mg/kg). The present study aimed to evaluate whether this difference is due to the pattern of subcellular accumulation of Cu in the liver. For this purpose, liver samples from 10 GB, 9 HF and 10 GBxHF young bulls were analysed to determine the content of metallothionein (MT) and Cu and zinc (Zn) (in the liver (Cu-liver and Zn-liver) and bound to metallothionein (Cu-MT and Zn-MT)). The Cu distribution within the main subcellular compartments (nuclei, large granule, microsomes and cytosol) was also determined. Even though HF animals showed significantly higher ($P < 0.05$) Cu concentrations in the liver (161 ± 10 mg/kg wet weight) compared with GB (132 ± 8 mg/kg), no breed-related differences were observed for any of the parameters considered in this study. Overall, the pattern of hepatic subcellular accumulation was similar to that previously described in cattle: (i) MT concentrations were lower than in other animal species but strongly related to hepatic Zn; (ii) a low proportion of Cu (6.61%) was bound to MT but this was strongly and negatively related to the Cu:Zn ratio in the liver cell; and (iii) the highest proportion of Cu (57.3%) was found in the large granule (lysosome containing) fraction. All these results indicate a low capacity of cattle to excrete Cu by the bile resulting in a high Cu accumulation in the liver cell.

1. Introduction

Trace element supplementation has been used routinely in the animal feed industry without full consideration of the background concentrations in the feed materials. This has led to the provision of amounts of trace elements greatly exceeding the physiological requirements of the animals [1]. However, in recent years the philosophy of trace element supplementation has changed substantially. In addition to considering the efficacy of trace element additives in relation to animal health and performance, their safety for consumers (via animal-source food) and maximum levels in the environment must be clearly addressed [2].

The problems associated with excessive trace element supplementation are exemplified by considering copper (Cu) requirements in animals, particularly in ruminants. Cu deficiency is very frequent in ruminants worldwide [3] and many animals benefit from Cu being included in their diet. However, if the amounts of Cu supplied exceed the physiological needs, large amounts of Cu may accumulate in the

liver, potentially leading to chronic Cu toxicity [4]. This has potential consequences for the consumer, and maximum regulatory limits (MRL) have been proposed in order to address this problem [5].

Previous studies on intensively reared beef cattle in NW Spain [6] have shown that young bulls of Holstein-Friesian (HF) breed accumulate more Cu in the liver than these of the Galician Blonde (GB) breed or the crosses of GB and HF (GBxHF). Moreover, in a substantial proportion of the HF young bulls (42%), the hepatic Cu concentrations are above safe-adequate levels [6]. This may have consequences for animal health as oxidative damage has been described [7] and may pose a risk to the consumer. Our findings are consistent with other recent findings across Europe showing that subclinical chronic Cu toxicity in cattle is more frequent than generally assumed [8]. This poses a problem in animal nutrition.

Sheep are particularly susceptible to chronic Cu poisoning, and hepatic Cu metabolism has therefore been widely studied in this species [9,10]. The susceptibility is thought to be related to the fact that the sheep liver cannot accumulate large amounts of metallothionein (MT)-

* Corresponding author.

E-mail address: marta.miranda@usc.es (M. Miranda).

bound Cu (Cu-MT). In mammals, Cu absorbed in the intestine is generally transported to the liver, where it is utilized in normal hepatocyte metabolism, stored as Cu-MT or, if present in excess, excreted in bile [11]. MT seems to play a major role in the excretion of Cu in the bile, both by a direct route through the hepatocyte cytoplasm or, more importantly, by the hepatolysosomal route, in which Cu-MT is sequestered by lysosomes for excretion in the bile [12]. If there is a large influx of Cu into the liver, the capacity of the MT to bind Cu and of the lysosomes to remove Cu from the cytosol may be exceeded. The Cu is then accumulated at a higher rate in other organelles (mainly in the nucleus) or, when particularly high concentrations of Cu are stored, it may remain in the cytosol as free Cu ions; in both cases Cu is responsible for important alterations in liver structure and function [11,13].

Sheep breeds display large differences in Cu metabolism, and some breeds have even been identified as resistant or tolerant to Cu [3]. These differences seem to be related to the capacity of the animal to excrete Cu in the bile [14]. Although some breed-related differences in Cu requirements have been described in cattle (Simmental and Charolaise appear to have higher Cu requirements than Aberdeen Angus [15]) and attributed to differences in Cu biliary excretion, studies of subcellular hepatic Cu metabolism in cattle are scarce.

The aim of this study was to determine whether the pattern of subcellular hepatic accumulation of Cu explains the higher hepatic Cu accumulation observed in HF than in GB young bulls in Galicia (NW Spain). For this purpose, we evaluated the role of MT in binding Cu and analysed the subcellular distribution of Cu in different liver compartments in HF, GB and GBxHF crosses.

2. Material and methods

2.1. Liver samples

In the present study, liver samples originated from 10 GB, 9 HF and 10 GBxHF young bulls of a previous investigation of liver Cu status after feeding a high Cu-supplemented diet were used [17]. Briefly, the bulls were grown from age 12–36 weeks (body weight range ca. 130–390 kg) in a commercial feedlot and were fed a concentrate diet containing a standard mineral supplement (Co (0.5), Fe (32), I (0.5), Mn (40), Se (0.1) and Zn (32) mg/kg of concentrate) with the maximum level of Cu supplementation allowed by the EU legislation (35 mg Cu as copper sulphate/kg feed) [16]. For further details about the animals and diets, see Miranda et al. [17]. Samples were taken from the caudate lobe of the livers immediately after the animals were slaughtered at age 36 weeks. The samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before being processed.

2.2. Subcellular fractionation

About 1 g of liver was homogenized in 6 vols of 0.25 M sucrose (pH 8, 4°C) with a Potter–Elvehjem homogenizer. The material was fractionated as described by Corbett et al. [18]. Briefly, the homogenate was centrifuged (Beckman centrifuge, model J2–21) at 600g for 10 min to separate the nuclear pellet (nuclei, plasma membranes, unbroken cells), and the resulting supernatant was centrifuged at 8500 g for 12 min to separate the large-granule pellet (mitochondria and lysosomes). The supernatant obtained in this step was centrifuged (Beckman ultracentrifuge, model L7–80, 70 Ti rotor) at 105,000g for 60 min to separate the microsomal pellet (endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, ribosomes) from the cytosol (including Cu-MT, other soluble proteins and free ions). Enzyme assays were conducted to confirm the effectiveness of the fractionation procedure, as also described by Corbett et al. [18].

Table 1

Liver content of metallothionein (MT) and copper and zinc content in the liver (Cu-liver and Zn-liver) and bound to metallothionein (Cu-MT and Zn-MT) in Holstein Friesian (HF), Galician Blonde (GB) and their crosses (GBxHF). Data are expressed in arithmetic mean \pm SEM. Different superscript letters indicate statistical differences between groups ($p < 0.05$).

	HF (n = 9)	GB (n = 10)	GBxHF (n = 10)	P
MT (mg/kg WW)	177 \pm 48	114 \pm 10	132 \pm 8	0.222
Cu-liver (mg/kg WW)	161 \pm 10 ^a	132 \pm 8 ^b	154 \pm 6 ^{ab}	0.028
Cu-MT (mg/kg WW)	12.53 \pm 3.91	6.62 \pm 0.88	8.62 \pm 1.14	0.201
%Cu-MT [*]	7.51 \pm 1.90	5.09 \pm 0.64	5.65 \pm 0.72	0.336
Zn-liver (mg/kg WW)	44.9 \pm 5.5	38.7 \pm 1.1	40.5 \pm 1.4	0.370
Zn-MT (mg/kg WW)	4.47 \pm 1.01	4.21 \pm 0.88	3.79 \pm 0.46	0.878
%Zn-MT [*]	9.50 \pm 1.40	11.02 \pm 2.45	9.24 \pm 0.95	0.734

WW: wet weight.

^{*} %Cu-MT and % Zn-MT: expressed as percentage of the Cu or the Zn content in the liver.

2.3. MT assays

MT was determined by a modification of the silver (Ag) saturation method [19]. Briefly, aliquots of between 0.1 and 0.5 mL of liver cytosol were first adjusted to a sample volume of 2.4 mL with 0.5 M glycine pH 8.5. The samples were mixed with 1 mL of AgNO₃ solution (20 μg Ag/mL glycine buffer). Complete saturation of the samples was ensured by using various aliquots of the sample. Excess Ag was removed and precipitated by addition of 0.2 mL of 2% haemoglobin solution (in buffer). The solution was then heat treated in a water bath (about 100°C for 1 min) and centrifuged at 1000g for 5 min at room temperature. These steps were repeated two more times. The final supernatant fraction was analysed to determine the amount of Ag by ICP-OES, and the MT concentrations were calculated assuming a molar ratio of Ag(I)/MT of 17 [19].

2.4. Metal content in liver, bound to MT and other subcellular fractions

To determine Cu and Zn concentrations in the liver, 0.5 g of tissue was digested with concentrated nitric acid (Suprapur, Merck) and hydrogen peroxide by microwave-assisted digestion.

The fractions present in the liver supernatant after heat treatment were assumed to be the Cu and Zn bound to MT (Cu-MT, Zn-MT) [20]. The supernatant was obtained by first heating (72°C for 5 min) and then chilling (in an ice-cold bath) one mL of liver cytosol; the heat-denatured proteins were removed by centrifugation at 1600g for 5 min, and the final supernatant was analysed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES, Perkin–Elmer Optima 4300 DV, Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT USA).

Subsamples (0.5–1 mL) of liver homogenate and of subcellular fractions were digested in 1 mL of 69% concentrated nitric acid and 0.2 mL of 33% w/v hydrogen peroxide. Digested samples were transferred to polypropylene sample tubes and diluted to 5 mL with Milli-Q ultrapure water. Metal concentrations in the digest were determined by ICP-OES.

2.5. Analytical quality control

Analytical quality control was applied throughout the study. Two blanks and an in-house reference material (-80°C cattle liver homogenate) were processed with each batch of 6 samples to detect any background contamination and to monitor the between-batch consistency of analysis. A certified reference material (SRM: Standard Reference Material® 1577c Bovine Liver; National Institute of Standards & Technology) was also analysed with each batch of samples to determine the analytical recovery. Blank absorbance values were

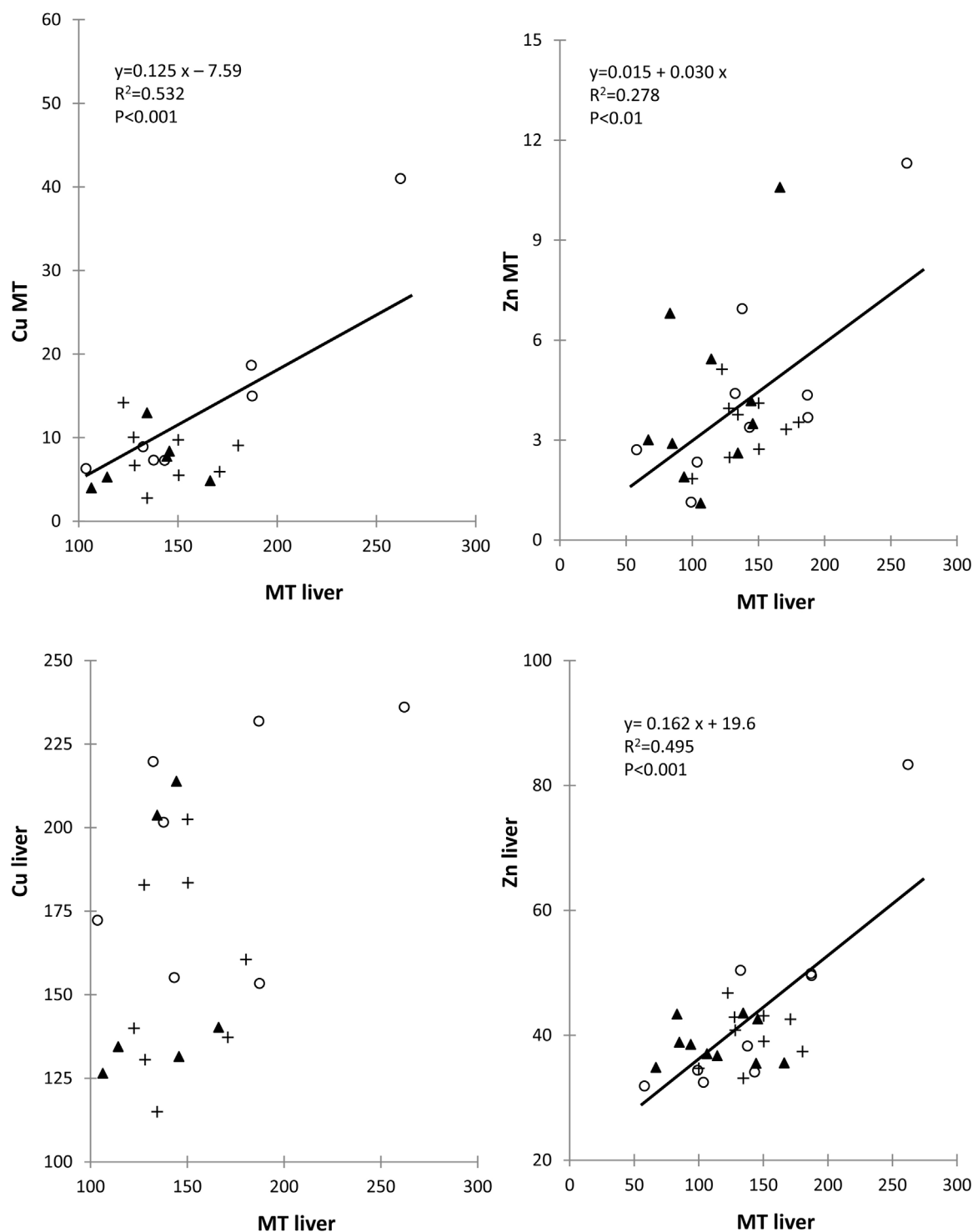


Fig. 1. Relationship between hepatic metallothionein (MT) concentrations (mg/kg liver) and Cu and Zn concentrations (mg/kg liver) in the liver and bound to MT. (o: Holstein-Friesian (HF); ▲: Galician-Blonde (GB); +: crosses GBxHF).

subtracted from the readings before the final concentrations were calculated. The limits of detection (LoD) in the acid digest, established as three times the standard deviation of the mean blank value, were 5.9 and 3.4 µg/L for Cu and Zn, respectively. The Cu and Zn concentrations in all sub-fractions analysed were above the LoD. The limits of quantification (LoQ), expressed as a concentration in the tissue and based on the mean sample weight, were 7.22 (MT), 0.203 (Cu-MT), 0.284 (Cu-liver), 0.098 (Zn-MT) and 0.127 (Zn-liver) mg/kg wet weight (WW). The concentrations in all samples were above the LoQ. The precision of the overall method was calculated as the relative standard

deviation (% RSD) of the absorbance readings from the in-house reference material. These values varied between 4.9% and 9%. Analytical recovery (mean ± SD) from the SRM was 97.7 ± 4.7% for Cu and 98.4 ± 7.5% for Zn.

2.6. Statistical analyses

All statistical analyses were conducted using SPSS for Windows (v. 20.0). One liver sample showed a MT concentration identified as an outlier (542 mg/kg, studentized residual > 3.0) and was removed from

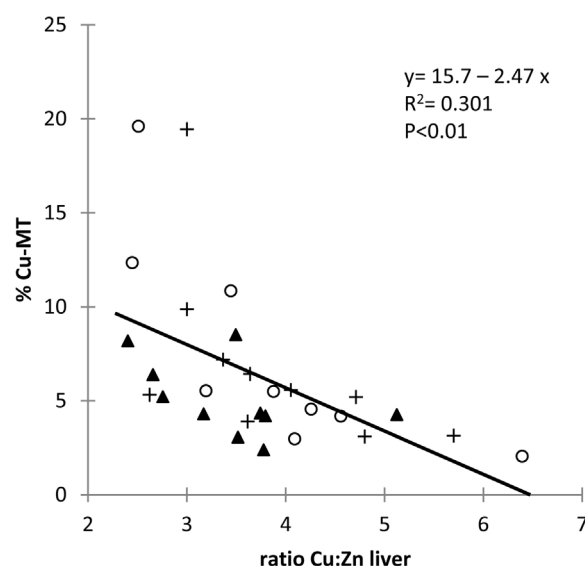


Fig. 2. Relationship between the proportion (%) of Cu bound to metallothionein (MT) of the Cu concentration in the liver and the Cu:Zn ratio (by weight) in the liver. (o: Holstein-Friesian (HF); ▲: Galician-Blonde (GB); +: crosses GBxHF).

Table 2

Subcellular distribution of copper (Cu) in the main compartments (nuclei, large granule, microsomes and cytosol) (expressed as percentage of liver Cu content) in Holstein Friesian (HF), Galician Blonde (GB) and their crosses (GBxHF). Data are expressed in arithmetic mean \pm SEM.

	HF (n = 9)	GB (n = 10)	GBxHF (n = 10)	P
%Cu-nuclei	18.1 \pm 1.5	14.0 \pm 0.9	16.1 \pm 1.7	0.219
%Cu-large granule	41.4 \pm 3.2	41.1 \pm 2.0	42.2 \pm 2.1	0.763
%Cu-microsomes	9.6 \pm 0.9	12.4 \pm 0.9	11.2 \pm 1.2	0.587
%Cu-cytosol	30.9 \pm 2.6	32.5 \pm 1.7	30.6 \pm 1.6	0.738

the analysis. The Kolmogorov–Smirnov test was used to check whether the data were normally distributed. ANOVA with post-hoc Tukey test were used to examine the influence of breed on MT, Cu and Zn concentrations in the liver and within the different subcellular fractions. Regression analysis was used to assess the relationships between (i) hepatic MT and Cu and Zn concentrations (both in the liver and bound to MT), (ii) the Cu:Zn ratio in the liver and the proportion of metals bound to MT and (iii) Cu in the liver and Cu in the different subcellular compartments. In the text and the tables the arithmetic mean \pm standard error of the mean (SEM) are described.

3. Results

Table 1 shows liver content of MT and Cu and Zn in the liver (Cu-liver and Zn-liver) and bound to MT (Cu-MT and Zn-MT) in the HF, GB and GBxHF crosses under study. Cu concentrations in the liver were significantly higher ($P = 0.028$) in HF than in GB and were intermediate in the GBxHF. All animals showed higher hepatic Cu concentrations than the adequate levels (25–100 mg/kg WW; [21]) and 66, 20 and 60% of liver samples of HF, GB and GBxHF respectively exceeded the MRL (140 mg/kg WW) for human consumption [5]. No breed-related differences were observed for Zn concentrations in the liver, all animals had hepatic Zn concentrations within the physiological range (25–100 mg/kg WW; [21]).

The MT concentrations varied widely (ranging between 58 and 262 mg/kg WW). The mean MT concentrations were higher in HF than in GB and were intermediate in the GBxHF, although the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). The same pattern was found when considering the concentrations of MT-bound Cu and Zn: the mean concentrations were numerically higher in HF than in GB animals

and intermediate in the crossbreeds ($P > 0.05$).

Fig. 1 shows the relationship between hepatic MT and Cu and Zn in the liver (on the bottom) and bound to MT (upper part of the figure). The MT concentrations were not correlated with the liver Cu content ($R^2 = 0.06$, $P > 0.05$), but were strongly associated with Zn content ($R^2 = 0.495$, $P < 0.001$). However, Cu-MT ($R^2 = 0.532$, $P < 0.001$) and Zn-MT ($R^2 = 0.278$, $P < 0.01$) were positively correlated with MT concentrations; these results indicate that although Cu is a poor inducer of MT synthesis, Cu can bind to MT by competing with Zn for the binding sites.

Large individual variations in the proportion (in% of the total element) of MT-bound Cu and Zn were observed (ranging from 2.1–19.6% for Cu-MT and 3.0–29.8% for Zn-MT), although these were not related to breed ($P > 0.05$; Table 1). The% Cu-MT was strongly related to the Cu:Zn ratio (by weight) in the liver (Fig. 2). For ratios of 2–3, 5–20%, of the total Cu in the liver was bound to MT, but this percentage decreased to below 2–4% at a higher Cu:Zn ratio of approximately 4–6.

Table 2 shows Cu concentrations (expressed as% of the concentration of the element in the liver) in the different subcellular compartments (nuclei, large-granule, microsomes and cytosol) for the three breeds. As found for Cu-MT, no statistically significant differences were observed in relation to breed ($P > 0.05$ in all cases). Overall, the granular fraction was the main compartment for Cu storage (42.2%), followed by the cytosol (31.2%) and the nuclei (15.4%), whereas the lowest proportion (11.2%) was contained in the microsomal fraction.

Analysis of the hepatic subcellular distribution in relation to the liver Cu storage (Fig. 3) revealed a similar pattern in all fractions. The Cu concentration in nuclei, large-granules, microsomes and cytosol increased with the hepatic Cu loading.

4. Discussion

The results of this experimental study in intensively-reared young bulls receiving a standard diet with the maximum level of Cu supplementation allowed by the EU legislation (35 mg/kg feed, [16]) show a very similar pattern of hepatic Cu accumulation to that previously described in animals naturally exposed to relatively high Cu and Zn concentrations by feeding on pasture treated with pig slurry [22,23]. The MT concentrations measured in the animals in the present study were lower than reported for other animal species [24] and were highly dependent on the animal Zn status [25]. Cu is known to have a poor capacity to induce MT, although, as demonstrated in our study, it can compete efficiently with Zn for MT binding sites [13,25]. Due to the low MT concentrations in cattle, the proportion of Cu and Zn bound to MT was very low – 6.6 and 9.9% from the total liver concentration of Cu and Zn – in comparison with other Cu-tolerant species (for example, 60% in non Cu-exposed and up to 80% in Cu-loaded pigs [11]). Moreover, the percentage of Cu-MT was significantly related to the Cu:Zn ratio in liver cells [22]. That means, cattle has not only a low capacity for safe storage of Cu bound to MT to be delivered through the bile, but also this capacity largely decreases as hepatic Cu loading and consequently the Cu:Zn ratio increases. This may be important in ruminants, particularly in sheep, as biliary Cu excretion is directly related to Cu bound to MT [14].

We did not observe any breed-related differences in the concentrations of MT or in the proportion of MT-bound Cu and Zn that could explain the higher hepatic Cu accumulation observed in HF young bulls. The MT concentrations were very variable within the three cattle groups, considering that the MT concentrations are known to be highly dependent on the dietary (and consequently hepatic) Zn concentrations [13,25] and that all animals in the present study received the same standard diet (32 mg Zn/kg feed) during all the experiment. However, other factors such as age, sex and hormonal status [25], some stress and infection stimuli strongly affect MT concentrations. Moreover, in addition to regulate Cu and Zn metabolism, MT also plays an important

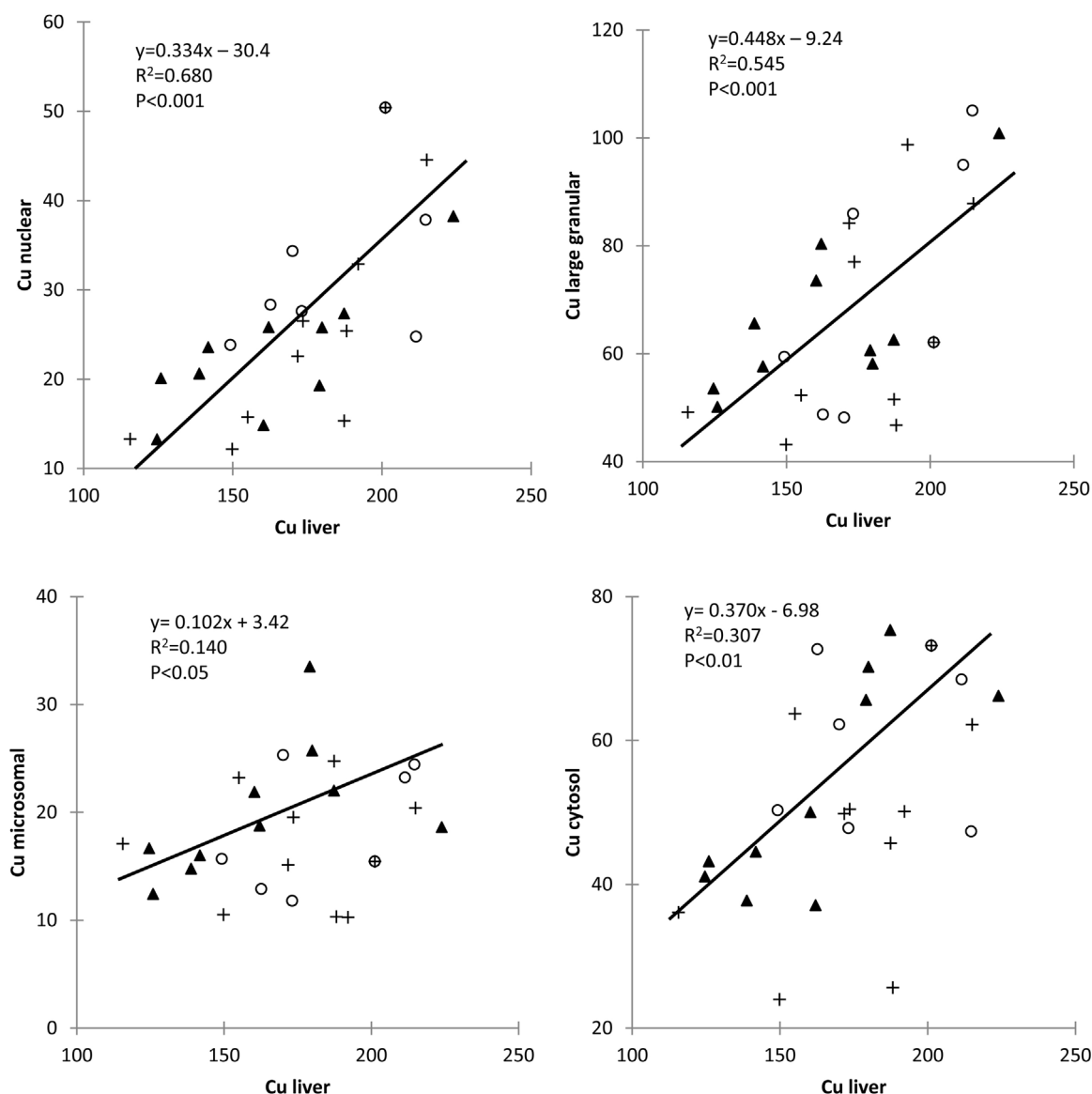


Fig. 3. Relationship between Cu concentrations (mg/kg liver) in the main subcellular fractions (nuclei, large granule, microsomes and cytosol) against liver Cu concentration. (o: Holstein-Friesian (HF); ▲: Galician-Blonde (GB); +: crosses GBxHF).

role in heavy metal detoxification and radical-scavenging activity that form part of biological defence mechanisms [26].

The distribution pattern observed within the subcellular compartments in the present study was also very similar to that described in previous studies in Cu-loaded ruminants. The large-granule fraction was the main compartment for Cu accumulation, followed by the cytosol and nuclei, whereas the Cu concentration in the microsomal fraction was very low [9,10,14]. This pattern contrasts with that observed in Cu tolerant species such as the pig, in which most of the Cu accumulates in the cytosol [27,28].

The Cu concentration in all four fractions increased as the Cu load in the liver increased. At the tested high dietary Cu content, the capacity for biliary Cu excretion is overloaded, and Cu begins to accumulate at a higher rate in the large granule fraction. Once the plateau phase is reached, Cu begins to enter the nucleus or remains free in the cytosol, causing important oxidative damage. In our study Cu accumulation follows a linear increase in all subcellular compartments, indicating that the plateau phase with great risk of haemolytic crisis has not been reached [4].

We did not observe any differences between tested breeds in the proportion of Cu in each subcellular compartment or about the way in

which Cu was distributed at each compartment as the Cu loading increased. The susceptibility of sheep to Cu toxicity and differences between breeds are thought to be related to a limited capacity of lysosomes (large granule fraction) to excrete Cu through the bile [29] primarily because protein-bound Cu is not available for sequestration [14]. In the few previously mentioned studies in cattle, biliary Cu excretion of Simmentals has been reported to be at least twice as high as in Aberdeen Angus for similar nutritional conditions [30]. When Cu is not excreted by the bile, it is stored in hepatocellular cytoplasm and lysosomes in MT-bound forms [11,15]. If the higher hepatic Cu accumulation in HF young bulls observed in this study were explained by a lower capacity for Cu biliary excretion, a higher percentage of the hepatocyte Cu would be expected in the large-granule fraction (lysosome containing) than found in GB. However, there was no breed-difference in the large granule Cu and in the Cu detected in the other three subcellular fractions (Table 2). Here, it should be considered that in our study only one single dose of Cu (the maximum allowed in animal nutrition by the EU legislation) was tested. A dose-response experiment could show differences between breeds at other level of Cu exposure.

In addition to possible differences in the Cu biliary excretion

capacity, the susceptibility of different breeds to Cu at a constant intake may be related to differences in the absorption and the size of the liver related to the body weight [31]. An absorption effect could not be studied up to now; however, there are differences in the liver size. In the present experiment, the HF animals had a higher liver weight of 13.3 g/kg body weight than that of GB (11.9 g liver/kg body weight) [17]. In the HF breed with the breeding goal “milk yield”, milk synthesis with protein, fat and lactose requires a high liver activity expressed by higher relative liver weight as compared with the GB and GBxHF with the focus on muscle and meat. Muscle tissue (= lean meat, lean beef) has a relatively low Cu content in the range of 0.361–1.29 mg/kg fresh weight in the semitendinosus muscle [17]. Indeed, the HF breed represents less muscle than the GB bulls [17]. Assuming a regular Cu flow into the muscle tissue the higher muscular mass of the more meaty breeds could explain, at least in part, the lower liver Cu concentration as compared with the HF bulls. In a long-term comparison of “milk- and meat-cattle breeds”, the need of Cu and further trace elements for milk and muscle synthesis should be considered. For high yielding dairy cows the integration of liver trace element store into synthesis of milk nutrients should be evaluated. This means that any empirical breed comparison could be qualified by a factorial approach studying the requirement of Cu for synthesis of milk and muscle tissue.

5. Conclusion

Under the conditions of a high dietary Cu content no breed differences were observed regarding the capacity to synthesize hepatic MT and to bind Cu to MT and to distribute Cu within the main subcellular compartments. Unlike sheep (and possibly some bovine breeds) where it is well demonstrated that susceptibility to Cu accumulation depends on the genetic ability to bind Cu to MT which can be excreted into the bile, the higher hepatic Cu accumulation of HF compared to GB, seems to be related to other aspects of Cu metabolism. Considering all the available information in the animals under study [17], the most plausible explanation for the higher hepatic Cu accumulation in HF young bulls is a lower Cu metabolic need related to lower muscular mass.

Acknowledgements

This work was supported by the Xunta de Galicia (Spain) under grant PGIDIT04RAG261005PR and 07MRU030261PR. The authors thank Lucia Casanova Iglesias and staff of RIAIDT for their technical assistance. The English grammar of the text was revised by Christine Francis.

References

- [1] M. López-Alonso, Trace minerals and livestock not too much not too little, *ISRN Vet. Sci.* (2012), <http://dx.doi.org/10.5402/2012/704825> Article ID 704825, 18 pp.
- [2] EFSA, Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP), guidance for the preparation of dossiers for nutritional additives, *EFSA J.* 10 (1) (2012), <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2535> [14 pp].
- [3] N.F. Suttle, *Mineral Nutrition of Livestock*, fourth ed., Cabi Publishing, Wallingford, UK, 2010.
- [4] M. López-Alonso, Evaluation of chronic hepatic copper accumulation in cattle, in: T. Yoshida (Ed.), *Micronutrients and Health Research*, Nova Science Publishers, 2008, pp. 207–226.
- [5] EFSA, Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP), scientific opinion on the safety and efficacy of copper compounds (E4) as feed additives for all animal species. cupric sulphate pentahydrate based on a dossier submitted by Manica S. p. A, *EFSA J.* 10 (12) (2012), <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2969> (2969 [38 pp.]).
- [6] M. Miranda, J.M. Cruz, M. López-Alonso, J.L. Benedito, Variations in liver and blood copper concentrations in young beef cattle raised in north-west Spain: associations with breed, sex, age and season, *Anim. Sci.* 82 (2006) 253–258.
- [7] M. García-Vaquero, M. López-Alonso, J.L. Benedito, J. Hernández, B. Gutiérrez, M. Miranda, Influence of Cu supplementation on toxic and essential trace element status in intensive reared beef cattle, *Food Chem. Toxicol.* 49 (12) (2011) 3358–3366.
- [8] C.A. Bidewell, J.R. Drew, J.H. Payne, A.R. Sayers, R.J. Higgins, C.T. Livesey, Case study of copper poisoning in a British dairy herd, *Vet. Rec.* 170 (2012) 464–469.
- [9] S.R. Gooneratne, J.M.C. Howell, J. Gawthorne, Intracellular distribution of copper in the liver of normal and copper loaded sheep, *Res. Vet. Sci.* 27 (1979) 30–37.
- [10] J.S. Kumaratilake, J.M.C. Howell, Intracellular distribution of copper in the liver of copper-loaded sheep—a subcellular fractionation study, *J. Comp. Pathol.* 101 (2) (1989) 161–176.
- [11] I. Bremner, Nutritional and physiological significance of metallothionein, *Methods Enzymol.* 205 (1991) 25–35.
- [12] S.R. Gooneratne, B. Laarveld, R.K. Chaplin, D.A. Christensen, Profiles of ^{67}Cu in blood, bile, urine and faeces from ^{67}Cu -primed lamb: effect of ^{99}Mo -labelled tetrathiomolybdate on the metabolism of recently stored tissue ^{67}Cu , *Brit. J. Nutr.* 61 (1989) 355–371.
- [13] I. Bremner, Manifestations of copper excess, *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (1998) 1069S–1073S.
- [14] W.W. Saylor, R.M. Leach, Intracellular distribution of copper and zinc in sheep. effect of age and dietary levels of the metals, *J. Nutr.* 110 (1980) 448–459.
- [15] S.R. Gooneratne, W.T. Buckley, D.A. Christensen, Review of copper deficiency and metabolism in ruminants, *Can. J. Anim. Sci.* 69 (1989) 819–845.
- [16] Commission Regulation, (EC) No 1334/2003/EC on amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements, *OJ L187* (2003) 11–15.
- [17] M. Miranda, B. Gutiérrez, J.L. Benedito, I. Blanco-Penedo, M. García-Vaquero, M. López-Alonso, Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper, *Arch. Anim. Nutr.* 64 (2) (2010) 98–110.
- [18] W.W. Corbett, T.A. Saylor, Intracellular distribution of hepatic copper in normal and copper-loaded sheep, *J. Anim. Sci.* 47 (1978) 1174–1179.
- [19] A.M. Scheuhammer, M.G. Cherian, Quantification of metallothionein by silver saturation, *Methods Enzymol.* 205 (1991) 78–83.
- [20] K.T. Suzuki, K. Yamamoto, Y. Ogra, S. Kanno, Y. Aoki, Mechanisms for removal of copper from metallothionein by tetrathiomolybdate, *J. Inorg. Biochem.* 54 (1994) 157–165.
- [21] Mineral levels in animal health, in: R. Puls (Ed.), *Diagnostic Data*, second ed., Sherpa International, Clearbook, BC, 1994.
- [22] M. López-Alonso, F. Prieto, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández, J.L. Benedito, The role of metallothionein and zinc in hepatic copper accumulation in cattle, *Vet. J.* 169 (2005) 262–267.
- [23] M. López-Alonso, F. Prieto, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández, J.L. Benedito, Intracellular distribution of copper and zinc in the liver of copper-exposed cattle from northwest Spain, *Vet. J.* 170 (2005) 332–338.
- [24] R.B. Henry, J. Liu, S. Choudhuri, C.D. Klaassen, Species variation in hepatic metallothionein, *Toxicol. Lett.* 74 (1) (1994) 23–33.
- [25] I. Bremner, J.H. Beattie, Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions, *Proc. Nutr. Soc.* 54 (1995) 489–499.
- [26] M. Nordberg, Metallothioneins. historical review and state of knowledge, *Talanta* 46 (1998) 243–254.
- [27] R.K. Mehra, I. Bremner, Species differences in the occurrence of copper-metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper-loaded animals, *Biochem. J.* 219 (2) (1984) 539–546.
- [28] I. Bremner, J.H. Beattie, Metallothionein and the trace minerals, *Annu. Rev. Nutr.* 10 (1990) 63–83.
- [29] J.A. Woolliams, N.F. Suttle, G. Wiener, A.C. Field, C. Woolliams, The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content, *J. Agric. Sci. Camb.* 100 (1983) 441–449.
- [30] S.R. Gooneratne, H.W. Symonds, J.V. Bailey, D.A. Christensen, Effects of dietary copper, molybdenum and sulphur on biliary copper and zinc excretion in Simmental and Angus cattle, *Can. J. Anim. Sci.* 74 (1994) 315–325.
- [31] E.T. Littledike, T.E. Wittum, T.G. Jenkins, Effect of breed, intake and carcass composition on the status of several macro and trace minerals of adult beef cattle, *J. Anim. Sci.* 73 (1995) 2113–2119.







TESIS DOCTORAL